

QL
951
J57

Journal of

Embryology and Experimental Morphology

VOLUME 1

March 1953

PART 1



PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLarendon Press

EDITORIAL BOARD

M. ABERCROMBIE (London)	SIDNIE M. MANTON (London)
G. R. DE BEER (London)	P. B. MEDAWAR (London)
J. D. BOYD (Cambridge)	D. R. NEWTH (London)
J. BRACHET (Brussels)	J. PASTEELS (Brussels)
F. W. R. BRAMBELL (Bangor)	CHR. P. RAVEN (Utrecht)
A. DALCQ (Brussels)	A. STEFANELLI (Rome)
E. FAURÉ-FREMIET (Paris)	S. TOIVONEN (Helsinki)
HONOR B. FELL (Cambridge)	C. H. WADDINGTON (Edinburgh)
W. J. HAMILTON (London)	M. W. WOERDEMAN (Amsterdam)
J. HOLTFRETER (Rochester, N.Y.)	ET. C. WOLFF (Strasbourg)
S. HÖRSTADIUS (Uppsala)	J. Z. YOUNG (London)
F. E. LEHMANN (Bern)	S. ZUCKERMAN (Birmingham)

Editor: M. ABERCROMBIE

INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they connect with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be in English, French or German.

Journal of Embryology and Experimental Morphology is published quarterly. Subscription price £4. 4s. 0d. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the JOURNAL is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE
OXFORD UNIVERSITY PRESS
AMEN HOUSE, LONDON, E.C.4

1127K

Foreword

by A. M. DALCQ

SEVERAL journals, formally dedicated to zoology, morphology, anatomy, cytology, or biology, more rarely to embryology, are already open to the publication of studies on development. Nevertheless, the need for a new periodical which would be primarily devoted to morphogenesis has been felt in recent years by many embryologists. Professor Woerdeman, in particular, tackled this problem immediately after the last war, but the conditions of the moment did not allow him to realize his fine scheme. In the meantime, our Japanese colleagues took a similar initiative and founded, in 1950, their journal *Embryologia*. In Europe there is certainly space for an enterprise run on an international scale. Accordingly, all students of morphogenesis will be grateful to the British embryologists for having taken over the project of their Dutch colleague. Professor Woerdeman willingly put the results of his preliminary inquiries at the disposal of the British group, which he soon joined. His collaboration is the more important in that he is the Chairman of the Institut International d'Embryologie, a foundation playing a prominent and constantly increasing role in our scientific movement.

By progressive co-option, the group of sponsors soon grew to the present Editorial Board. Thanks to the assistance of the British Council, most of its members held an inaugural meeting early in the present year. Arrangements were made for the publication of the new *Journal of Embryology and Experimental Morphology* by the Company of Biologists Ltd.; and the Wellcome Trust has greatly facilitated the task of starting the journal by offering the Company a generous guarantee against financial loss during the first two years of publication.

This new instrument for forwarding scientific information and co-operation will probably answer to the wishes of many embryologists. When they take a bird's-eye view of the work accomplished in their field during the first half of this century they can perceive a curve of activities which reveals, in spite of two sad interruptions, a constant expansion. If, as every scientist heartily wishes, the coming years are favourable to peaceful and disinterested laboratory life, the progress of our studies could well outrun all former estimations. Indeed, the great anonymous *opus*, which the science of development strives to be, is experiencing a tremendous phase of growth and differentiation.

The period where the gross aspects of development had simply to be described is coming to an end, although much remains to be done in some groups. But new tasks constantly appear as much on the purely embryological level as when recourse is had to the methods of neighbouring sciences. One characteristic of the

present period is a certain temporary prevalence of observation at the expense of experimentation. Many of us feel strongly the necessity for a better understanding of the germinal protoplasm, for a more precise knowledge of its physical and chemical organization which must be in some way responsible for morphogenesis. But each step in the appropriate use of cytochemical reactions, or of the improved physical means of observation now at our disposal—optical, photometrical, photo-electrical, electronic, radio-electrical, and other devices!—entails a series of cautious inquiries, involving regular publication of papers.

For those who still feel more tempted by experimentation, the same technical requirements unavoidably weigh upon the rhythm of progress and increase the probability of frequent publication. In both observation and experiment the recourse to biochemistry has become a perpetual preoccupation. In spite of the immense work already performed, it must be admitted, provisionally, that some crucial aspects of early morphogenesis, those bound up with field relations and induction processes, still escape our range of attack. However, the use of the most sensitive methods of immunology and of radioactive tracers immediately awakens new hopes, and this too promises a serious output of special contributions.

It is also obvious that embryologists will now be confronted with an extraordinary extension of their field in depth, in space, and in time.

In depth, owing to their constant wish to reach to the macromolecular level, a tendency which does not need to be stressed.

In space, according to circumstances which require some comment. On the one side, it appears that we are on the verge of establishing the common denominator of morphogenesis in regeneration and asexual reproduction and in embryonic development. The recent confirmation of real induction processes in regeneration seems to be a decisive step in this direction.

On the other hand, a tremendous programme of investigation is called for concerning mammalian development. These eggs put before us the problems of morphogenesis in their very barest and most powerful aspects, but also under the most difficult conditions for the gathering of material and for the methods of manipulation. This present task remains within the evolutionary line of our discipline. The pioneers of the last century had their attention mainly focused on mammals. Then, owing to the technical difficulties encountered and to the need felt for a broader inquiry, this group was, for a while, more or less neglected. It will be to the lasting honour of the Carnegie Institution that it gave to the late Professor George L. Streeter the means to ensure the renewal of these studies, as he did in the Baltimore Department of Embryology. The invaluable collections gathered under his enthusiastic guidance, and with the marvellously efficient collaboration of Dr. C. H. Heuser, have contributed greatly to bring back our attention to the development of man. Indeed, we can still assert that the factual event of human ontogeny represents, in spite of such appreciable advances, our major problem. But to attain this goal, many direct—in so far as is permitted by

our ethical rules—and comparative studies will be necessary. Wild mammalian species of all continents need accurate investigation. This is the more difficult in that the classical methods of fixing and sectioning have generally become insufficient; field laboratory work should be organized for that purpose. Perhaps it is well to remind oneself that the morphogenetic abilities of mammalian and human protoplasm refer to properties which are scarcely noted in our current manner of considering cellular life. These barely known activities could well be of some medical interest.

It is also from a mainly human point of view that we may claim for our researches an extension 'in time'. This is likewise the result of an evolution which has gradually effaced the conventional boundaries between the biological phases of life. After the initial prospecting of early or embryonic stages attention has gradually shifted to the processes of cytodifferentiation—which are only beginning to be explored and faintly understood—and then to growth with its subjacent synthesis of living and inert materials. Now, it becomes plausible that, to a limited but important extent, the forces controlling morphogenesis remain active in the processes of cell-replacement, proliferation, differentiation, and ageing which constantly take place behind the apparently stable frontage of the organs. Such insidious changes leading to structural reconstruction offer dynamic aspects in direct relation with those of early development, and something might probably be won by studying them from the same angle.

These general previsions could perhaps be thought ambitious for a discipline which is still considered by many scientists as an auxiliary one. We are more probably underestimating the situation, for unforeseen aspects will certainly come to light, owing to the exceptional scope and position of our problem. It is not necessary to emphasize here that eggs, buds, and germs of all kinds are, as it were, condensers of life activities. For that reason our researches, together with those of the geneticists, really touch the root of all biological problems. Perhaps it is permissible to think that they have a still wider meaning when we read from the hand of a well-known physicist¹: 'Form, not substance, the fundamental concept.'

But the broader the implications of our investigations, the more it is necessary to foresee some limits to the hospitality of this journal. The Editorial Board has agreed to accept contributions which aim at the general goal of exploring more thoroughly how living, non-pathological structures are built up, increased, maintained, repaired, transformed, either at the supracellular, or cellular, or macromolecular level. Most of the published works will concern the animal realm, but it is planned that occasional papers or reviews may throw out a bridge towards morphogenesis in unicellular and plant organisms.

With this comprehensive orientation, the *Journal of Embryology and Experimental Morphology* hopes to help the gradual elaboration of a synthetic view on the intricate processes of morphogenesis.

¹ E. Schrödinger, *Science and Humanism* (Cambridge University Press, 1951), p. 18.

Conscious of the gratitude they owe to their predecessors and senior colleagues, the members of the Editorial Board wish to dedicate this new journal to some of the prominent embryologists who have during their long careers made such patient, painstaking, and successful efforts for the progress of our science. In France, Professor Paul Ancel, who has been both one of the pioneers in sexual endocrinology and a wonderful experimentalist on early stages; Professor Maurice Caullery, whose indefatigable zeal for our discipline has inspired the vocation of several distinguished morphogeneticists; in Germany, Professor Karl Peter, who has added so many extensive and precise contributions to our knowledge of the amniotes; in Great Britain, Professor James P. Hill, whose outstanding works have brought to light major aspects of proterian, metatherian, and eutherian development; in Italy, Professor Giuseppe Levi, who, by his cytological researches, especially by his cultures of embryonic cells, has evoked a group of well-known students of morphogenesis; in Sweden, Professor Nils Holmgren, whose researches splendidly demonstrate the persistent value of comparative embryology; in the United States, Professor Charles Manning Child, whose creative thought, based on innumerable new data, instilled into the interpretation of development reinvigorating concepts; Professor Ross Granville Harrison, whose unimpeachable experiments have unravelled several riddles of amphibian development; Professor Warren H. Lewis, who has constantly been at the vanguard of investigators exploring the early stages of vertebrates. All of them have been the colleagues and often the friends of other great embryologists who unfortunately can no more hear our words of thanks. These late masters and pioneers of our discipline still live in our memory and the quotation of their memoirs and books is a lasting tribute to their value.

After these lines of dedication, we have only to wish God-speed to the new vessel we are daring to launch. May it be welcomed by all those in the world who study the fascinating problem of morphogenesis!

Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens

I. Mécanisme de la formation des organes secondaires aux dépens de l'ectoblaste

par J. PASTEEELS¹

Université de Bruxelles, Laboratoire d'Embryologie de la Faculté de Médecine

AVEC TROIS PLANCHES

INTRODUCTION

LA centrifugation a été utilisée souvent comme moyen d'investigation de la morphogenèse chez les Amphibiens, mais ses effets aux divers stades n'avaient jamais été comparés de façon systématique.

Quand, en 1937, nous avons étudié les effets de la centrifugation sur les œufs insegmentés de la Grenouille, nous avons ensuite été entraînés à confronter les résultats obtenus avec les anomalies éventuelles provoquées par ce traitement à d'autres stades. Contrastant avec la forte sensibilité des œufs insegmentés, la période de la segmentation, jusqu'à la jeune blastula y comprise, se caractérise par une indifférence relative; en aucun cas on n'y peut provoquer la formation d'anomalies. En revanche, peu avant et peu après le début de la gastrulation survient une nouvelle phase de sensibilité, plus ou moins nette suivant les espèces. Toutefois, les troubles du développement produits à ce stade prennent une tout autre allure que les hypomorphoses produites par la centrifugation de l'œuf insegmenté.

En réalité, ces anomalies étaient connues depuis longtemps et on trouve dans la littérature d'assez nombreuses indications au sujet 'd'embryons secondaires', ou de 'queues surnuméraires' produites par la centrifugation du germe des Amphibiens peu avant, ou pendant la gastrulation. Citons A. M. Banta & R. A. Gortner (1915), M. Bagini (1925), P. Pasquini & G. Reverberi (1929), H. W. Beams, R. L. King & P. L. Risley (1934), enfin A. M. Schechtman (1937).

Cependant il nous est apparu que le mécanisme de ces curieuses déformations n'avait jamais été expliqué de façon satisfaisante. Même l'hypothèse de Schechtman, la plus plausible de celles qui aient été avancées, ne peut être

¹ Author's address: Laboratoire d'Embryologie, Faculté de Médecine de l'Université, 97 rue aux Laines, Bruxelles.

retenue. D'après cet auteur, il s'agit d'une action de l'organisateur sur une voûte blastocoeliennes effondrée venant se mettre en contact avec la zone marginale. Comme nous le verrons cette interprétation se montre inadéquate pour trois raisons. (a) La plupart des localisations de ces 'embryons secondaires' ne correspondent pas à l'éventualité d'un contact de la voûte blastocoeliennes et de la zone marginale. (b) Ces formations secondaires ne peuvent être obtenues que si on centrifuge l'œuf soit au stade blastula, soit à la toute jeune gastrula; dès le moment où le blastopore présente la forme d'une petite fauille, la centrifugation devient inefficace; la période sensible ne correspond donc nullement à la chronologie de l'induction. (c) Enfin il nous est apparu que ces 'embryons secondaires', par leur caractère incoordonné, leur manque d'équilibre entre composantes neurales et mésoblastiques, le mélange éventuel de ces tissus, ne ressemblent pas aux effets d'un inducteur normal, mais bien — et à s'y méprendre — aux résultats obtenus par un inducteur hétérogène, tel qu'un fragment de tissu adulte (cf. J. Holtfreter, 1934; H. H. Chuang, 1939; S. Toivonen, 1940).

Cependant lorsque nous avons dû abandonner ce travail au cours de la guerre, nous en étions arrivé au point où on saisit l'intérêt d'un problème sans en entrevoir encore la solution. Sur ces entrefaites, l'étude de l'induction avait pris un tour inattendu: J. Holtfreter (1944, 1945, 1948) démontrait qu'un traitement 'subcytolytique' peut produire une neuralisation autonome de l'ectoblaste, en l'absence de tout inducteur. Aussi, quand nous avons repris nos expériences au cours des années s'étendant de 1945 à 1949, nous disposions d'une clef qui, comme nous le verrons, s'est montrée efficace; une interprétation nouvelle s'est dégagée, et a pu être démontrée par la combinaison d'expériences de centrifugation, d'explantation et de greffe.

Comme nous le verrons, les effets de la centrifugation ne diffèrent pas seulement, suivant le stade où les germes sont centrifugés, mais encore suivant les espèces dont ils proviennent.

Cette étude systématique de la sensibilité suivant les espèces et les stades constituera l'objet d'un second mémoire, tandis qu'un troisième envisagera les répercussions produites par la présence d'un axe embryonnaire supplémentaire sur la morphogenèse normale. Nous nous bornerons à présent à étudier la nature et la genèse des systèmes et organes supplémentaires produits par la centrifugation. Une discussion approfondie ne pourra être présentée qu'au terme final de ces exposés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La centrifugation a été réalisée au moyen d'une centrifugeuse électrique. Après quelques tâtonnements, nous nous sommes arrêté pour toutes nos expériences à l'accélération, relativement modérée, de 460 g., car une accélération plus grande ne modifiait en rien les résultats, si ce n'est en affectant la survie des embryons. Les temps de centrifugation ont varié de 10 secondes à 10 minutes, le résultat optimal étant déjà nettement atteint en-dessous de cette dernière durée.

Ce temps de centrifugation est compris entre le moment où la centrifugeuse est déclenchée et celui où le contact électrique est coupé; il y a donc lieu d'y ajouter un certain nombre de tours supplémentaires dû à l'inertie de l'appareil; il faut ajouter que pour les temps de centrifugation courts, le régime de 460 g. n'était pas atteint.

Des expériences d'explantation ont été réalisées chez l'Axolotl et la Grenouille; quant aux greffes, il s'agit de greffes homoplastiques de *Xenopus* sur *Xenopus* ou hétéroplastiques de *Rana* sur *Triturus*. Le nombre et les modalités de ces expériences seront précisés au moment de leur description. Nous avons utilisé la technique usuelle du Laboratoire d'Embryologie de Bruxelles: opérations au fil ou à l'anse de platine, sur fond d'agar à 13 pour cent dans la solution de Holtfreter; élevage sur fond d'agar également, les explantats étant laissés sur fond d'agar tandis que les embryons greffés étaient reportés dans une solution plus diluée, de préférence de l'eau stérilisée par filtrage sur bougie. La survie est devenue totale dans nos dernières séries, à partir du moment où 1 pour mille de sulfamide (Elkosine Ciba) a été ajouté au milieu.

Après un examen préalable des germes vivants, un abondant matériel a été fixé et examiné sur coupes. (En ce qui concerne le nombre d'embryons étudiés, cf. le deuxième mémoire de cette série.) Nous avons habituellement fixé au Bouin et coloré les coupes à l'hématoxylène-éosine.

RÉSULTATS. 1. LA GENÈSE DES ORGANES SECONDAIRES

(a) Etude descriptive

Au sortir de la centrifugeuse, les œufs se présentent avec un pôle animal entièrement aplati, la voûte du blastocoèle étant affaissée au contact de son

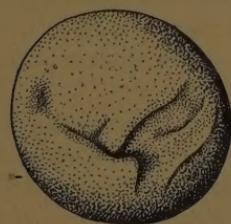


FIG. 1. Jeune gastrula de *Rana temporaria* examiné immédiatement au sortir de la centrifugeuse. L'œuf est vu par le pôle animal où des plis et des sillons trahissent l'affaissement de la voûte blastocoéline.

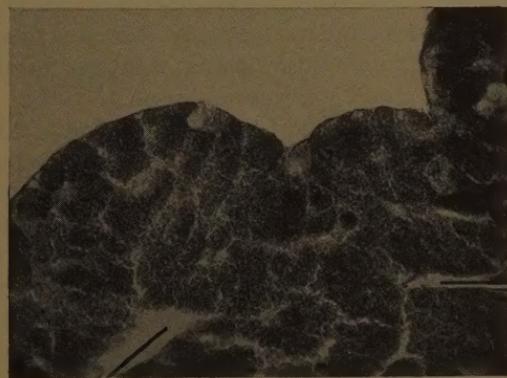


FIG. 2. Coupe à travers la voûte blastocoéline affaissée d'un œuf centrifugé de *Rana temporaria*. Bl., fente représentant ce qui reste du blastocoèle.

plancher. Toute la surface du pôle animal paraît ainsi aplatie mais sillonnée de plis irréguliers (Fig. 1, dans le texte). Une coupe verticale d'une blastula de

Rana temporaria immédiatement après la centrifugation montre que le blastocoèle est réduit à une simple fente (Fig. 2 dans le texte); sur cette même figure nous remarquerons aussi que les plis du pôle animal sont constitués par des amas de cellules ectoblastiques qui s'accumulent et se collent littéralement au contact du plancher blastocoelien.

Chez *Xenopus laevis*, le blastocoèle est écrasé également, mais suivant une modalité un peu différente (Planche 1, A): au-dessus d'un blastocoèle réduit à une fente assez étroite, la voûte blastocoeliennes constitue un amas compact et pluristratifié.

Dès les premières heures qui suivent la centrifugation, il est possible de prévoir les conséquences ultérieures de ce traitement. Comme nous le verrons (II^e mémoire), les œufs ne sont sensibles que dans des limites bien définies d'espèces ou de chronologie. Par exemple, chez la Grenouille ou chez le Xénope, dès le moment où le blastopore a pris la forme d'un croissant, aucune ébauche secondaire ne peut plus être obtenue. Mais un œuf centrifugé à ce stade et fixé immédiatement après la centrifugation, montrera bien entendu le même effondrement du blastocoèle, le même entassement de cellules ectoblastiques au contact du plancher. Mais dans ce cas, *cette situation ne persiste pas*: une à deux heures plus tard, nous voyons que la voûte du blastocoèle se déplisse, que sa cavité s'étend, et ainsi la situation normale se rétablit assez rapidement. Un tel exemple nous est donné par la Planche 1, B, qui concerne un œuf de Xénope, centrifugé au stade du petit blastopore en croissant, et qui a presque entièrement récupéré sa morphologie normale.

Tout autre est l'évolution qui mène à la formation d'organes surnuméraires. Les amas cellulaires profonds accumulés aux dépens de la voûte du blastocoèle *persistent*. Cela signifie que, déjà à ce stade, les caractéristiques physico-chimiques des cellules ont été modifiées. Les propriétés physiques du cortex des cellules ont dû se transformer au point que *les affinités réciproques des cellules ectoblastiques ont totalement changé*.

Il se forme ainsi un ou des amas de cellules ectoblastiques qui ne s'effacent pas dans la suite du développement. Leur localisation est très variable suivant les cas et ainsi les trouve-t-on, tantôt associés de façon intime aux organes axiaux primaires, lorsqu'ils se trouvent dans la partie dorsale du germe, ou bien encore rejetés dans les parties latérale ou ventrale de l'embryon. La première éventualité se verra sur la Planche 1, C, qui concerne un œuf de Xénope en neurulation. On s'apercevra ainsi à quel point les formes résultant de la combinaison anarchique des organes axiaux primaires et des organes surnuméraires deviennent incohérentes.

L'évolution des amas ectoblastiques qui persistent dans les parties ventro-latérales du germe est beaucoup plus claire. La Planche 1, D, par exemple, toujours chez le Xénope, nous montre un de ces amas placé sur la face ventrale d'une très jeune neurula. L'épais gâteau de cellules ectoblastiques détermine une forte saillie, bombant à la fois en surface et vers le mésoblaste ventral. Un

autre cas de la même série, fixé quelques heures plus tard se voit sur la Planche 1, E. L'amas ectoblastique, qui était dans ce cas latéral, s'est littéralement enclavé dans le manteau mésoblastique primaire; les cellules ectoblastiques et endoblastiques se reconnaissent toutefois par leurs caractères cytologiques notamment la teneur en vitellus. Un dernier cas de la même série, fixé encore quelques heures plus tard (Planche 1, F) montre un changement notable. Le gâteau que nous avons aperçu précédemment s'est clivé en deux plans, dont le superficiel constitue une plaque médullaire assez massive. L'examen de cette coupe nous réserve toutefois une autre surprise: dans toute la moitié du germe qui correspond à cette plaque médullaire, le manteau mésoblastique latéral semble avoir disparu: en d'autres termes, le 'gâteau' ectoblastique a attiré le mésoblaste voisin et se l'est intégré. Un examen à plus fort grossissement montre, que si la majeure partie de ce complexe latéral est bien constitué par des cellules ectoblastiques, reconnaissables à leur pigment et à leur petit vitellus, il s'y trouve cependant associées quelques cellules mésoblastiques à grosses plaquettes.

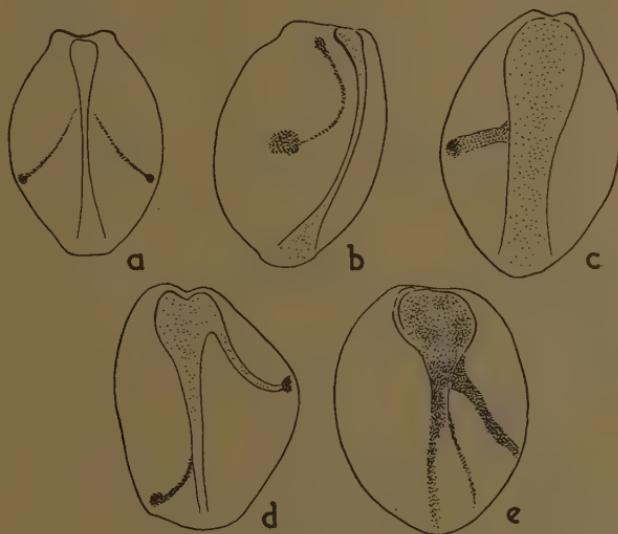
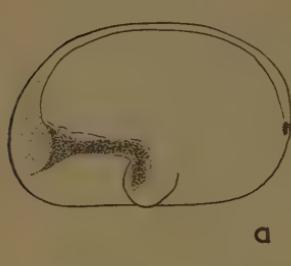


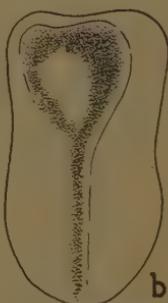
FIG. 3. Plaques médullaires, dessinées sur le vivant, d'œufs de *Pleurodele* ayant été centrifugés au stade blastula avancée.

Si nous retournons à présent à l'œuf vivant au stade neurula, nous en verrons des aspects sur les Fig. 3 à 7 dans le texte (Pleurodèle, Xénope, et Grenouille). Chez le Pleurodèle (Fig. 3) nous voyons, partant d'une saillie pigmentée, des plaques médullaires minces, parfois filiformes, qui, le plus souvent (Fig. 3, a, c, et d) s'étendent obliquement vers le dos et vers l'avant pour rejoindre la plaque médullaire primaire et se confondre avec elle. Parfois (Fig. 3, c) la direction de la plaque médullaire secondaire est à peu près transversale et

remonte donc directement vers la plaque primaire; rarement (Fig. 3, b), la plaque secondaire peut s'infléchir suivant un trajet parallèle à la plaque primaire. Chez le Xénopé nous voyons d'une part (Fig. 4, a) un embryon vu par le flanc; ici la protubérance est plus forte, il en part aussi une plaque médullaire qui va se confondre en avant avec la plaque normale. D'autre part, sur la Fig. 4, b, nous voyons une ébauche médullaire unique, mais anormalement dilatée en avant. Enfin, chez la Grenouille (Fig. 5) nous voyons une gouttière secondaire, les deux se confondent largement en avant.



a



b

FIG. 4. Neurulas d'œufs de *Xenopus* ayant été centrifugés au stade blastula. La Fig. a est vue de profil, l'extrémité céphalique dirigée vers la gauche; la Fig. b est orientée, la face dorsale tournée vers le haut.



FIG. 5. Plaque médullaire double (dessin *in vivo*) d'un germe de *Rana temporaria* centrifugé au stade jeune gastrula.

Lorsque la jeune larve est constituée, les aspects extérieurs varient évidemment suivant l'importance et le volume des formations secondaires. Celles-ci sont fonction, comme nous le verrons dans le second mémoire de cette série, soit des différences spécifiques entre les œufs, soit du stade auquel l'œuf a été centrifugé. La Fig. 6 nous montre quelques exemples de formations nettement caudiformes chez le Pleurodèle. Elles sont beaucoup plus massives dans les cas a, b, c que chez les embryons d, e, f (les deux catégories proviennent d'ailleurs de séries différentes). Des formations secondaires beaucoup plus volumineuses ont été obtenues chez la Grenouille: quelques exemples en sont dessinés sur la Fig. 7. Ce sont soit des saillies irrégulières dans la région ventrale, ou bien des queues plus ou moins bien constituées; en règle générale, la tête de l'«hôte» montre un relief très irrégulier.

L'étude microscopique montre davantage encore à quel point les résultats obtenus dépendent de l'espèce utilisée ou du stade auquel l'œuf a été soumis à la centrifugation. Ces variations nécessiteront une étude systématique (cf. le 2^e mémoire). Néanmoins, dès à présent, nous estimons utile de montrer deux exemples choisis dans une série (1938, exp. 21b), où les œufs de *Rana temporaria* ont été centrifugés tout au début de la gastrulation, ce qui, comme nous le verrons ultérieurement, permet d'obtenir un effet maximal.

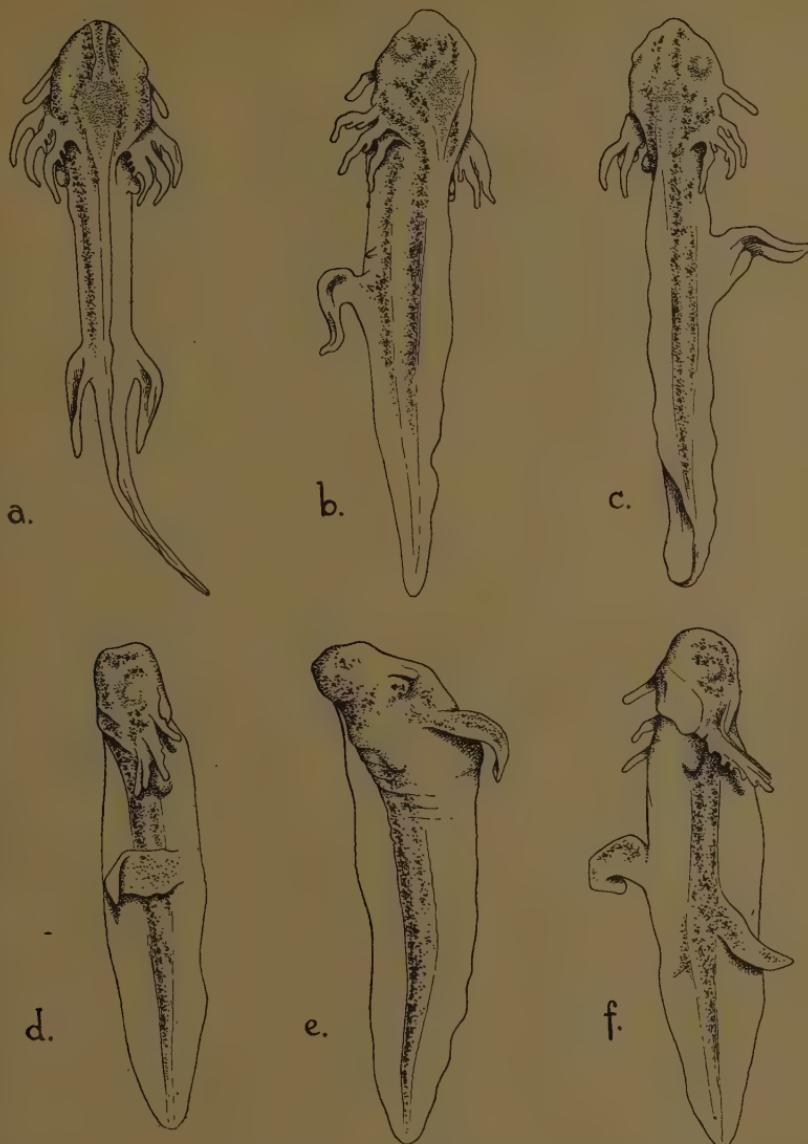


FIG. 6. Queues surnuméraires d'œufs de *Pleurodeles* centrifugés au stade blastula avancée.

(i) Larve 21-b-2. La tête est normale jusqu'au niveau des yeux. A ce moment (Planche 2, A) on observe un fort épaississement ventral de la région du chiasma; dans cette masse, les cellules tendent à s'orienter pour constituer une lumière, et

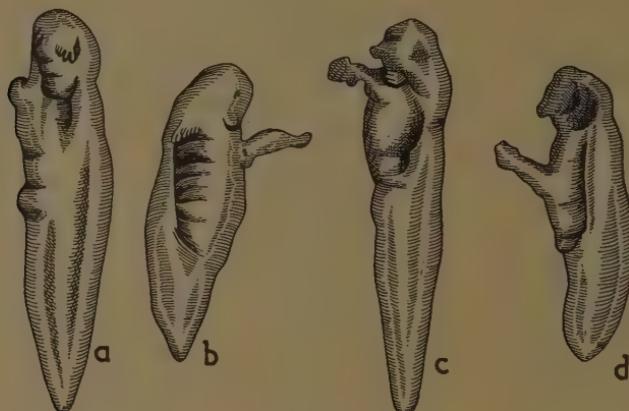


FIG. 7. Aspects macroscopiques d'embryons de *Rana temporaria* ayant été centrifugés au stade jeune gastrula.

au contact de l'ectoblaste ventral s'est constituée une petite épiphyse; les vésicules oculaires sont de taille nettement excessive. Plus en arrière, nous voyons encore une dilatation anormale de l'infundibulum, mais la masse nerveuse ventrale s'est isolée au contact de l'ectoblaste. Au niveau des otocystes (Planche 2, B) cette masse nerveuse a édifié un petit rhombencéphale, dépourvu de charnière basale; sur ses côtés quelques plis de l'ectoblaste prennent des aspects intermédiaires entre des placodes et des cellules ganglionnaires. Ce système nerveux 'secondaire', en position ventrale, a refoulé le pharynx et un stomodaeum n'a pu se constituer. Plus en arrière encore, à la hauteur du pronéphros, ce système nerveux ventral a pris l'aspect d'une moelle, entourée de mésenchyme, *sans chorde ni myotomes* (Planche 2, C); on la voit s'insérer latéralement dans un prolongement caudiforme assez irrégulier. Le bout de cette queue est constitué par un manchon mésenchymateux contenant une petite moelle atypique, une petite chorde encore immature en-dessous de laquelle se trouve une sangle de cellules myotomiales jeunes. Celles-ci se trouvent en continuité avec l'ectoblaste adjacent. Ceci confirme une conclusion qui résulte de l'examen cytologique des cellules de ce petit axe secondaire: *il est entièrement constitué — névraxe, chorde et somites — par des cellules dont la pigmentation et la teneur en vitellus sont caractéristiques de l'ectoblaste ventral*.

En conclusion: un axe secondaire petit, déficient surtout par sa chorde et ses myotomes, dépourvu de pronéphros et d'otocystes, s'étend sur la face ventrale de l'embryon. D'arrière en avant, il prend successivement les caractères d'une

queue, d'un tronc, d'un rhombencéphale. Il se confond en avant avec le diencéphale primaire qui est hypertrophié. Toutes ses cellules ont des caractères cytologiques qui permettent de les faire dériver de l'ectoblaste.

(ii) Larve 21-b-70. La disposition générale de l'axe secondaire est la même que dans le cas précédent. Aussi ne l'illustrerons-nous que par quelques photographies de l'embryon secondaire, prises à fort grossissement. La tête de l'embryon primaire est mal conformée, l'œil manquant du côté droit. En revanche on observe une forte hypertrophie de l'infundibulum qui s'étend dans toute la région ventrale de la tête en repoussant le pharynx sur le côté gauche. (Le pharynx est ainsi collabé, les poches branchiales ont une disposition atypique, le stomodœum est absent.) Dans la région nucale, on voit que le diverticule ventral du diencéphale se prolonge par un rhombencéphale, petit, mais typique, placé au milieu du ventre de l'embryon et accompagné d'un petit otocyste à droite. Il n'y a pas d'otocyste secondaire à gauche, tout au plus y remarque-t-on quelques épaississements placodiques de l'épiblaste. Une situation assez anarchique surgit dans la charnière basale de ce rhombencéphale; la différenciation histologique paraît indécise et brusquement nous voyons apparaître quelques cellules chordales dans la base même du névraxe (Planche 2, D). Un peu plus en arrière cependant le rhombencéphale se reconstitue normalement. Une véritable chorde, en tant qu'organe continu et indépendant du névraxe n'apparaît qu'à un niveau plus postérieur (Planche 2, E). Le névraxe secondaire a pris à présent une allure médullaire, et la chorde est flanquée, uniquement à droite, d'un amas de myotomes; toujours à droite, se trouve à côté de ces myotomes, un tube néphritique unique. Les cellules de ce morceau de pronéphros sont nettement d'origine mésoblastique, tandis que chorde, somites et névraxe sont *d'origine ectoblastique*, comme le prouvent la taille réduite des plaquettes, l'abondance du pigment, la réduction du volume cytoplasmique par rapport à celui des noyaux. Ce tronc secondaire, nettement asymétrique, se prolonge par une queue atypique, qui, en se recourbant vers l'avant, a déjà été intéressée par les coupes étudiées précédemment. Comme on le verra sur la Planche 2, F, cette queue est constituée d'une moelle typique, d'une tige chordale régulière, d'un paquet de myotomes très asymétriques, développés à droite et se prolongeant vers la gauche par une petite sangle passant sous la chorde, et de mésenchyme. *Tous ces tissus sont d'origine ectoblastique*, comme le montrent leurs caractères cytologiques.

Au total, nous observons dans cet embryon un axe secondaire, situé sur la face médio-ventrale. Cet axe est constitué d'une queue, d'un tronc et d'une région nucale. L'orientation générale de cet axe correspond à l'orientation céphalo-caudale normale de l'embryon, toutefois la queue s'incurve et s'infléchit normalement vers l'avant. Dans la tête, l'axe primaire et l'axe secondaire se soudent par un diencéphale hypertrophié au niveau de l'infundibulum. Cet axe secondaire est mal équilibré, les myotomes n'existent qu'à droite, il ne s'y trouve qu'un peu de pronéphros et un petit otocyste (il n'y en a pas à gauche); des

cellules chordales isolées apparaissent anormalement dans le plancher du rhombencéphale. Enfin, les caractères cytologiques montrent que comme dans le cas précédent — à l'exclusion d'un tube pronéphritique cependant — les organes secondaires sont constitués à partir de cellules ectoblastiques.

En résumé, dès les premières heures qui suivent la centrifugation, lorsqu'un processus morphogénétique secondaire s'installe, les propriétés de surface des cellules ectoblastiques se modifient. Les amas cellulaires provoqués par l'effondrement de la voûte blastocoeliennes restent cohérents, et au stade neurula ils forment des intumescences ectoblastiques qui contractent des rapports parfois très étroits avec le mésoblaste adjacent. Un peu plus tard, ces amas se délaminent en une couche superficielle neurale et chordoblastique. En surface, on peut voir se constituer des plaques médullaires accessoires dont la partie antérieure vient se confondre avec la plaque médullaire primaire, le plus souvent dans sa partie céphalique. Il en résulte la formation d'axes secondaires, ayant la même polarité céphalo-caudale que l'axe primaire, se confondant avec celui-ci au niveau de la tête. Ces axes secondaires sont constitués par des nuques, des troncs et des queues où la répartition des organes est mal équilibrée. L'examen cytologique démontre qu'ils proviennent — en tout ou en majeure partie — d'une transformation des cellules ectoblastiques du pôle animal; de façon accessoire, le mésoblaste ventral au contact duquel ces complexes se développent, peut participer à leur édification.

(b) Analyse expérimentale

Les transformations que nous avons vues se poursuivre de stade en stade nous font présumer que l'origine des organes secondaires — et ceci vaut autant pour la chorde, les somites que pour le névraxe — résulte d'une *transformation de l'ectoblaste* de la jeune gastrula. Il nous faut à présent élucider le mécanisme de cette transformation. L'hypothèse émise par Schechtman (1937): qu'il s'agirait d'un contact anormal de la voûte blastocoeliennes effondrée et d'un 'organisateur' se trouvant dans la zone marginale interne, ne peut être retenue. Tout au plus cela pourrait-il expliquer — à la rigueur — des organes supplémentaires associés à la région dorsale de l'embryon, mais d'aucune façon cette hypothèse ne peut rendre compte des axes secondaires se manifestant dans les régions ventrales ou latérales. Il faudrait ainsi imaginer la présence de propriétés inductrices dans tout le plancher blastocoelien, hypothèse peu satisfaisante, et d'ailleurs infirmée par l'ensemble des faits actuellement connus.

Il y a lieu de comprendre également pourquoi l'axe secondaire s'adapte d'une façon générale à la polarité céphalo-caudale primaire, et enfin pourquoi, en règle générale également, les deux systèmes axiaux (le normal et le surnuméraire) se rejoignent et se confondent au niveau de la tête. Trois questions sont donc posées: (1) le mécanisme de la transformation ectoblastique, (2) celui de la polarisation de l'axe secondaire, enfin (3) le déterminisme de la fusion partielle des axes embryonnaires au niveau de leurs parties cérébrales.

A ces trois questions il est possible de répondre de façon décisive par des interventions expérimentales relativement aisées.

(1) Pour décider si la transformation de l'ectoblaste est autonome, ou bien induite par un contact quelconque, l'expérience de choix consiste à planter la voûte blastocoeliennes *immédiatement* après la centrifugation et à la cultiver isolée dans la solution de Holtfreter. Bien entendu, il y a lieu de prendre, au cours de cette expérience, deux précautions essentielles. La première consiste à ne prélever que de l'ectoblaste présomptif, à l'exclusion de toute zone marginale. La seconde prévoit un nettoyage soigneux de la face profonde de l'ectoblaste effondré pour en enlever toute trace de cellules endoblastiques du plancher blastocoelien.

Les expériences ainsi faites chez la Grenouille rousse, immédiatement avant la gastrulation, sont pleinement conclusives, comme le montre le Tableau 1.

TABLEAU 1

	Stade de l'isolement	Nombre d'opérations	Nombre de survie	Différenciations		
				Névraxe	Chorde	Somites
Expérience 1949 VI (Témoin non centrifugé)	Toute jeune gastrula	20	20	—	—	—
Exp. 1949 V (centrifugation 2 min.)	Idem	32	32	31	31	21
Exp. 1949 VII (centrifugation 6 min.)	Blastula (6 heures avant la gastrulation à 20°)	32	29	17	16	—

(Nous reviendrons ultérieurement sur les différences obtenues entre les expériences V et VII.)

Une autre méthode consiste à prélever un fragment d'ectoblaste fraîchement centrifugé et à le greffer sur la région ventrale d'une gastrula normale. En raison de l'irrégularité et de la consistance assez lâche du greffon, cette opération est assez délicate à réaliser. Nous avons pu cependant réunir un certain nombre de résultats, quelques greffes homoplastiques (*Xénope* sur *Xénope*) ainsi qu'une douzaine de greffes hétéroplastiques (*Rana fusca* sur *Triturus helveticus*). Voici le sommaire des résultats obtenus dans cette dernière série (Tableau 2).

TABLEAU 2

No. de l'opération	Emplacement du greffon	Différenciations du greffon
2	Côté de la tête	Glande adhésive-Myélencéphale-Otocyste
3	Région abdominale ant.	Epiderme, mésenchyme, otocystes
4	Région branchiale	Otocyste, mésenchyme, ganglions
5	Région abdominale ant.	Myélencéphale, moelle, chorde
6	Région céphalo-ventrale	Glande adhésive et épaissements épidermiques ? (fixation précoce)
7	Région ventrale	Masse neuroïde et crête neurale
8	Côté de la tête	Chorde, somites, moelle
9	Région ventrale	Chorde, somites, moelle
10	Idem	Chorde, somites, moelle
11	Région céphalo-ventrale	Myélencéphale, moelle, chorde et somites
12	Région ventrale	Chorde, somites, moelle

(Les résultats de l'opération 1 manquent, à la suite d'une cytolysé précoce.)

Conclusion: Nous pouvons donc répondre sans ambiguïté aucune à la première question: *l'apparition d'organes secondaires variés résulte d'une transformation de l'ectoblaste; cette activation n'est pas due à une induction mais bien à un processus autonome déclenché directement au sein de l'ectoblaste par l'effet même de la centrifugation.*

(2) Si nous examinons, sur coupes, la structure des explantats de voûte blastocoeliennes centrifugées (Planche 2, G), nous serons surpris des différences profondes qu'ils présentent vis-à-vis des formations secondaires laissées *in situ*. Dans le premier cas, on ne peut vraiment pas parler d'«organes»; il s'agit plutôt d'amas tissulaires sans morphologie définie. Le tissu neural reste compact, et s'il s'y dessine une lumière, celle-ci sera tortueuse et de calibre irrégulier; en aucun cas on ne peut reconnaître un rhombencéphale, ni une moelle, ni quelqu'autre organe neural. La chorde ne présente aucune polarité; elle forme soit de gros amas, soit des boudins tortueux. Dans ces masses chordales, les cellules les plus vacuolisées se trouvent souvent à la périphérie, tandis que les cellules les moins âgées, cytologiquement, restent au centre du nodule. Il est évident que dans ce cas on ne peut parler ni de tête, ni de tronc, ni de queue.

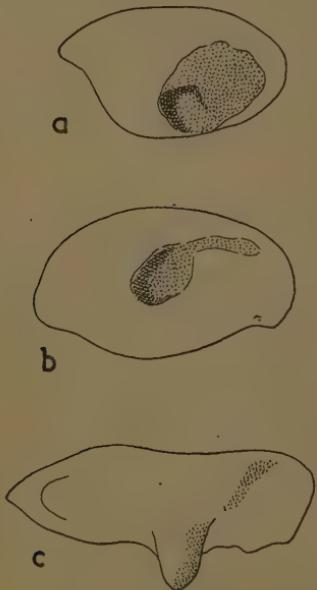


FIG. 8. Evolution d'une greffe d'ectoblaste centrifugé sur la partie latérale de l'ectoblaste d'une gastrula normale. Greffe homoplastique *Xenopus* sur *Xenopus*. La greffe, colorée, est reportée en pointillé. (a) Neurula jeune; (b) neurula avancée; (c) jeune larve; l'embryon étant toujours représenté de profil, la tête vers la droite.

In situ, la polarité des axes secondaires est, rappelons-le (cf. p. 13), indéniable. Il en résulte que si l'apparition de tissus hétérogènes au sein de l'ectoblaste doit être considérée comme autonome, l'intégration de ces tissus en un axe embryonnaire (d'ailleurs imparfait) est le résultat d'une influence venant du système primaire.

L'étude de la neurulation des embryons centrifugés nous donnait déjà quelque indication sur cette influence exercée par l'axe primaire (cf. Fig. 3 dans le texte). Nous avons vu en effet les plaques médullaires secondaires rejoindre la plaque primaire, le plus souvent suivant un trajet oblique en direction dorso-céphalique, tout comme s'il s'était passé une attraction à partir de l'axe primaire.

Cette attraction est réelle, comme le montrent les expériences de greffe. Par voie détournée, celles-ci réalisent une véritable synthèse des monstres produits par la centrifugation. La valeur analytique d'une telle expérience est décisive, puisque l'ectoblaste greffé est seul centrifugé et placé dans un hôte entièrement normal. La Fig. 8 dans le texte nous montre l'évolution d'une greffe homoplastique faite chez *Xenopus*.

Des œufs ont été centrifugés au stade blastula moyenne. La voûte du blastocoele effondrée a été soigneusement prélevée et greffée sur la région ventrale d'une gastrula (stade du blastopore en fer à cheval). Le lendemain de l'opération (Fig. 8, a) la greffe, reconnaissable par sa faible pigmentation, se trouve sur le flanc de l'hôte au stade neurula. Aucune connexion n'apparaît entre l'axe primaire de l'hôte et le greffon. Toutefois 9 heures plus tard (Fig. 8, b) on voit que la greffe a envoyé une sorte de pédicule en direction dorso-céphalique, venant ainsi rejoindre la partie postérieure de la tête de l'hôte. Le surlendemain (Fig. 8, c) la jeune larve est entièrement constituée. Sur la partie antérieure de son flanc gauche se voit un axe secondaire, reconnaissable par sa pigmentation; il s'étend obliquement vers le ventre et vers l'arrière, depuis la nuque de l'hôte jusqu'au milieu de sa région abdominale où il se termine par une queue. L'examen histologique montre successivement, d'arrière en avant: des épaissements ectoblastiques (placodes?) accompagnés d'un otocyste supplémentaire, une traînée de cellules ganglionnaires, enfin dans la queue, un petit névraxe et des somites.

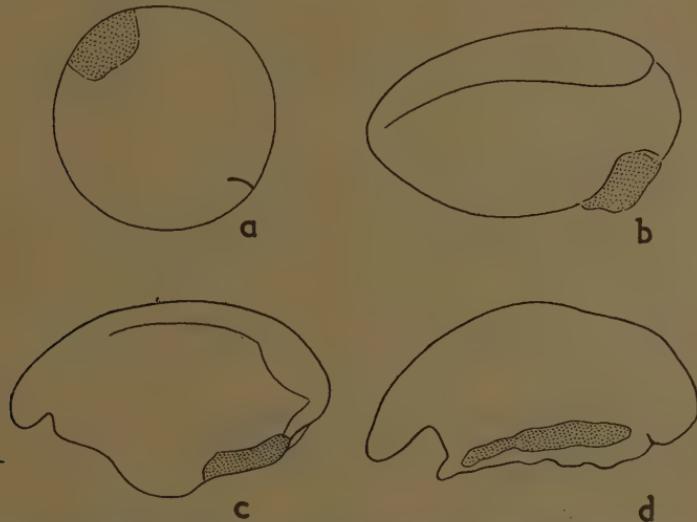


FIG. 9. Greffe hétéroplastique (*Rana* sur *Triturus*) d'ectoblaste centrifugé sur une jeune gastrula normale. La greffe est pigmentée. (a) Immédiatement après l'opération; (b) jeune neurula; (c) neurula avancée; (d) jeune larve.

Un exemple de greffe hétéroplastique: ectoblaste centrifugé de *Rana* sur gastrula de *Triturus helveticus* (Fig. 9 dans le texte) nous montre une évolution plus typique encore. La greffe a été reportée sur la région ventro-animale de l'hôte (Fig. 9, a); le lendemain matin, celui-ci est au stade de la plaque médullaire et la greffe se trouve au milieu de la région abdominale antérieure (Fig. 9, b). Comme on peut le voir sur cette dernière figure, la greffe est encore arrondie, la plaque médullaire de l'hôte étant normale. Neuf heures plus tard (Fig. 9, c), la

greffe tend à s'allonger et une connexion s'établit entre l'extrémité antérieure de la plaque médullaire de l'hôte et le greffon. (Nous insisterons sur ce point un peu plus loin.) Le surlendemain de l'opération (Fig. 9, *d*), la greffe s'est nettement allongée le long de l'abdomen de l'hôte et s'étend en arrière dans un petit processus caudiforme.

L'examen sur coupes de l'embryon fixé cinq jours après l'opération montre successivement d'avant en arrière: un myélencéphale connecté avec le cerveau de l'hôte, ensuite une chorde et une moelle.

A la seconde question nous pouvons donc répondre: *c'est sous l'influence de l'axe primaire que l'ectoblaste centrifugé acquiert une polarité céphalo-caudale, c'est sa localisation dans l'embryon primaire qui provoque l'apparition d'organes rhombencéphaliques ou troncaux.*

(3) La *fusion* partielle des extrémités céphaliques des axes primaire et secondaire résulte comme nous venons de le voir d'une attraction entre la partie — devenue céphalique — de l'ectoblaste activé et la tête normale. Il s'agit d'une *interaction réciproque*. De véritables ponts surgissent entre la plaque médullaire primaire et la masse ectoblastique activée. Les combinaisons xénoplastiques permettent de démontrer qu'il s'établit dans les tissus situés entre la tête normale et l'ectoblaste activé une élévation du potentiel morphogénétique ayant pour effet d'étendre la plaque médullaire primaire en un diverticule qui rejoint la partie céphalique de l'axe secondaire. C'est ce que nous montre l'exemple de greffe xénoplastique décrite plus haut (Fig. 9 dans le texte). La plaque médullaire de l'hôte était d'abord normale (Fig. 9, *b*); ensuite, au moment où le greffon s'allongeait (Fig. 9, *c*), un prolongement antérieur de la gouttière médullaire est venu *secondairement* rejoindre le greffon. L'examen histologique a montré que le cerveau du Triton hôte se prolonge effectivement par un diverticule ventral se combinant au rhombencéphale de *Rana*, provenant de la greffe.

Ces interactions entre systèmes primaire et secondaire méritent un examen détaillé que nous reprendrons dans le 3^e mémoire de cette série. Pour le moment, il nous suffira d'en avoir dégagé le principe.

Conclusion: (1) La formation de *tissus* neuraux, chordal et myotomial est déclenchée de façon autonome par l'effet direct de la centrifugation sur l'ectoblaste. (2) L'ectoblaste activé ne constitue un *système axial* et des *organes* qu'en fonction de sa position dans l'embryon primaire, sa polarité céphalo-caudale étant déterminée par celle de l'embryon primaire. (3) La combinaison fréquente des cerveaux primaire et secondaire est due à une élévation secondaire du potentiel morphogénétique entre les parties céphaliques des deux axes; elle résulte d'une interaction réciproque, l'axe primaire affectant l'axe secondaire mais étant également affecté par celui-ci.

RÉSULTATS. 2. LA SENSIBILISATION SUBLIMINALE

Les complexes d'organes décrits ci-dessus constituent presque des embryons secondaires; nous y voyons des organes axiaux situés dans la partie ventrale de

l'embryon et donc en grande partie indépendants de l'axe primaire. Cette modalité d'activation de l'ectoblaste est obtenue par la centrifugation de l'espèce la plus favorable, *Rana temporaria* aux stades les plus sensibles, la blastula avancée ou la très jeune gastrula. L'effet qui est ainsi obtenu est optimal et représente la modalité la plus accusée de l'activation de l'ectoblaste. Mais il en est d'autres.

Sans vouloir entrer dans le détail d'une étude systématique des résultats de la centrifugation en fonction des différences d'espèce et de stade — ce qui fera l'objet d'un second mémoire — nous tenons à élucider dès à présent le mécanisme d'une autre modalité, plus mitigée, de cette activation ectoblastique.

(1) Chez l'Axolotl, les effets obtenus par la centrifugation sont toujours plus discrets et ne se manifestent guère que par la formation de vésicules cérébrales supplémentaires, associées éventuellement à des placodes (olfactives ou auditives) et des dérivés de crête neurale, mais toujours en *connexion étroite avec le névraxe primaire*. La Planche 3 en donne quelques exemples. Les parties dorsales du prosencéphale sont dédoublées, ou sont même parfois le siège d'une ramification anarchique de la cavité ventriculaire. Au niveau du rhombencéphale la toile choroïdienne est souvent remplacée par un amas nerveux médiодorsal qui peut se continuer par un véritable septum médian clivant sagittalement le 4^e ventricule (Planche 3, B). Au voisinage de cet amas nerveux dorsal se voient le plus souvent des otocystes aberrants, des amas de ganglions et de mélano-phores (Planche 3, C). Cette neurogenèse supplémentaire peut prendre des aspects imprévus: par exemple la masse nerveuse dorsale peut se pédiculiser dans le ventricule et se prolonger en arrière par une sorte de moelle, entourant son propre épendyme, baignant dans la cavité épendymaire primaire (Planche 3, F).

Le plus souvent ces formations nerveuses supplémentaires ont un caractère orthotopique, étant de même nature que la partie du névraxe dans laquelle elles sont incluses; parfois cependant, elles peuvent être de caractère hétérotopique. Il est assez fréquent de rencontrer, près de la partie dorsale du rhombencéphale une vésicule nerveuse et une grosse placode à caractère nettement olfactif (Planche 3, A). Les réactions, assez rares dans le tronc, se manifestent d'habitude par un dédoublement de la nageoire dorsale; dans un cas cependant, nous voyons la moelle se prolonger dorsalement en une masse d'allure rhombencéphalique, accompagnée d'ailleurs d'un otocyste (cf. Planche 3, D et E).

Mais, de toute façon, l'examen de plusieurs centaines d'embryons permet d'affirmer que, chez l'Axolotl, ce supplément d'organes nerveux ou placodiques est *toujours* étroitement associé au névraxe primaire; jamais d'organes supernuméraires ne se manifestent sur les côtés ni sur le ventre de l'embryon.

(2) Lorsque les œufs de *Rana temporaria* sont centrifugés à des stades allant de la blastula jeune à la blastula moyenne (15 à 18 h. après fécondation, la culture étant maintenue à 20°) l'organogenèse supplémentaire est également dépendante de l'axe primaire. Les résultats obtenus dans ces conditions sont

très analogues à ceux décrits plus haut chez l'Axolotl, à une différence près cependant. Outre les diverticules du prosencéphale, ou les dédoublements du rhombencéphale qui se présentent de la même façon que chez l'Axolotl, on observe, irrégulièrement dispersés au sein du névraxe, des nodules de tissu chordal. La Planche 3, G et H montre par exemple une vésicule oculaire dont la majeure partie est transformée en chorde à proximité de laquelle se voit un petit otocyste. Ces nodules se trouvent tantôt dans le prosencéphale, comme nous venons d'en voir un exemple, tantôt dans le rhombencéphale. Dans ce dernier cas, ils peuvent rester distincts, ou bien encore, sortir du plancher neural et confluer avec la chorde primaire. Il s'agit toutefois dans cette dernière éventualité, d'une fusion secondaire.

(3) Tant chez l'Axolotl que chez la Grenouille centrifugées aux stades relativement jeunes, la transformation de l'ectoblaste ne se réalise donc qu'*au niveau et au contact* du névraxe primaire. Cette constatation laisse présumer que le champ morphogénétique primaire de l'embryon pourrait être indispensable à la réalisation des organes parasites. Des expériences d'explantation et de greffe vont nous permettre de mettre cette hypothèse à l'épreuve.

(a) Dans deux lots d'œufs d'Axolotl provenant de pontes différentes, les œufs ont été centrifugés au stade de la blastula avancée. Dans les deux cas, cette opération a entraîné plus de 80 pour cent de neuralisations supplémentaires suivant le type décrit plus haut. Dans chacune de ces deux expériences, immédiatement après la centrifugation, l'ectoblaste a été excisé et cultivé dans la solution de Holtfreter dans un certain nombre d'œufs (20 pour une expérience, 30 dans l'autre). Ces cinquante explantats ont donné des résultats entièrement négatifs: une simple prolifération ectoblastique indifférenciée, sans aucune cellule nerveuse d'aucune sorte, ne différant donc en rien de l'explantation éventuelle d'un ectoblaste normal.

Chez la Grenouille, on se rappelle (cf. p. 15) que l'explantation de l'ectoblaste d'un œuf centrifugé au stade jeune gastrula, mène à la formation de tissus neuraux, chordaux, mésoblastiques (cf. Tableau 1, p. 15). Rien de semblable ne se constate lorsque c'est la blastula jeune qui a été centrifugée. L'ectoblaste, qui, comme nous venons de le voir, est susceptible de former — au contact du névraxe primaire — des formations neurales et même de la chorde, ne montre *aucun* pouvoir de différenciation en explantat, et comme chez l'Axolotl ne diffère en rien d'une explantation d'un ectoblaste normal. Ainsi le montre l'expérience suivante résumée dans le Tableau 3.

TABLEAU 3
Rana temporaria. Œufs centrifugés à 17 h. après fécondation (20°)

	Nombre total de cas étudiés	Névraxe supplémentaire	Nodules chordaux
In situ	50	43	37
Explantats	30	—	—
Explantats témoins (œufs normaux)	20	—	—

Donc, chez l'Axolotl et chez la Grenouille aux stades de la blastula jeune, la sensibilisation de l'ectoblaste doit être considérée comme subliminale et reste sans effet lorsque l'ectoblaste est écarté du champ d'organisation primaire.

(b) Des expériences de greffes réalisées chez l'Axolotl viennent préciser le rôle du champ morphogénétique primaire.

Un lot de jeunes gastrulas d'Axolotl, préalablement colorés in toto au bleu de Nil, a été centrifugé. Vingt-cinq œufs ont servi de contrôle et ont montré dans 23 cas des vésicules neurales supplémentaires associées au cerveau.

Dans 18 cas, l'ectoblaste a été enlevé immédiatement après centrifugation et greffé sur des gastrulas normales et incolores. Ces greffes ont été faites suivant deux modalités différentes (cf. schéma, Fig. 10). Dans une série comportant 11 embryons, la greffe a été placée au niveau de l'ectoblaste ventral (épiblaste présomptif) (Fig. 10, a). La localisation de la greffe colorée a été contrôlée dans tous les cas au moment de la neurulation. Tous les embryons de cette série se sont développés normalement.

Dans la seconde série comportant 7 cas, la greffe a été portée délibérément en position très dorsale, en partie dans le territoire neurectoblastique (cf. schéma,

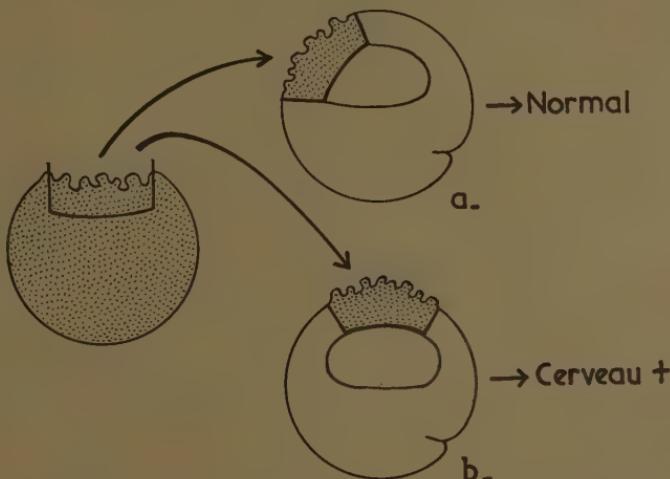


FIG. 10. Schéma de deux types d'opération chez l'Axolotl: (a) ectoblaste de gastrula centrifugée greffé sur la partie ventrale d'une gastrula saine; (b) même opération, mais la greffe est placée au pôle animal débordant sur le territoire nerveux présomptif de l'hôte.

Fig. 10, b). Dès le stade de la plaque médullaire, des irrégularités se manifestaient dans la greffe colorée incluse dans le névraxe. *Dans les sept cas*, des vésicules neurales supplémentaires sont apparues au niveau du cerveau.

Nous pouvons donc conclure: l'excédent de tissu cérébral que l'on obtient chez l'Axolotl après centrifugation de la jeune gastrula est dû à un effet

cumulatif de la sensibilisation subliminale de l'ectoblaste et du pouvoir induc-
teur de la voûte archentérique normale.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

Nous réservons toute discussion jusqu'à la publication du dernier mémoire de cette série, et nous nous bornerons actuellement à un simple exposé des résultats.

1. La centrifugation de la blastula ou de la gastrula à une accélération de 460 g. pendant 1 à 10 minutes provoque un effondrement de la voûte blastocoeliennes. Dans la suite du développement deux éventualités peuvent se présenter: (a) si la centrifugation a été faite à un stade non sensible (comme celui du blastopore en croissant chez la Grenouille) la voûte du blastocoel se déplisse et le développement reste normal; (b) lorsque les œufs ont été centrifugés à un stade sensible (blastula avancée ou toute jeune gastrula chez *Rana* ou *Xenopus*), les cellules de la voûte blastocoeliennes collabées forment un amas cohérent qui persiste, et au sein duquel s'installe un processus morphogénétique.

2. Au moment de la neurulation, cet amas de cellules animales, localisé sur le flanc ou le ventre de l'embryon, se scinde en deux couches, la supérieure formant des structures neurales, l'inférieure des organes chordo-mésoblastiques. En surface on assiste à la formation de petites plaques médullaires secondaires, qui prennent en général l'orientation de la plaque médullaire primaire et se confondent avec elle dans leur partie céphalique.

3. Les embryons secondaires les plus différenciés, obtenus par la centrifugation de la toute jeune gastrula chez *Rana temporaria*, se caractérisent comme suit: le névraxe se compose le plus souvent d'un rhombencéphale et d'une moelle; en avant il émerge du cerveau primaire avec lequel il est confondu; il est accompagné de chorde, de somites, parfois de tubes néphritiques; ces formations se terminent souvent par une structure caudale. Cette tendance à la formation d'un axe embryonnaire est cependant imparfaite et toujours dysharmonique: il n'existe pas de corrélation normale entre la taille du névraxe et celle du chondromésoblaste sous-jacent, ni entre la chorde et les somites qui l'accompagnent habituellement.

4. Cet effet morphogénétique est produit par une activation directe des cellules ectoblastiques. Cette conclusion est basée sur deux preuves expérimentales: (a) L'ectoblaste présomptif prélevé immédiatement après la centrifugation, isolé et cultivé *in vitro*, forme des complexes neuro-chordo-mésoblastiques; (b) Les axes secondaires peuvent être reproduits en greffant l'ectoblaste prélevé immédiatement après la centrifugation, sur la partie ventrale d'une gastrula saine, soit en greffe homoplastique (*Xénope* sur *Xénope*), soit en greffe hétéroplastique (Grenouille sur Triton).

5. Les complexes tissulaires obtenus après explantation restent amorphes, ne constituent pas de véritables organes ni d'axes embryonnaires. Les expériences de greffes susdites démontrent: (a) que c'est le champ d'organisation primaire

de l'embryon qui leur imprime une disposition axiale, à polarité céphalo-caudale; (b) que la confluence du cerveau primaire et du 'cerveau' secondaire est due à une élévation secondaire du potentiel morphogénétique des territoires situés entre les deux systèmes.

6. A côté de ces manifestations majeures, on peut observer des résultats plus discrets, obtenus par exemple après centrifugation de la blastula jeune chez la Grenouille, ou de la jeune gastrula chez l'Axolotl. Il s'agit dans ce cas de vésicules cérébrales supplémentaires ou de complexes organiques neuro-sensoriels toujours associés au névraxe primaire. Chez la Grenouille, ces anomalies s'accompagnent de nodules chordaux intracérébraux.

7. Cette 'sensibilisation subliminale' est incapable de manifester ses effets en explantation. Ses manifestations nécessitent l'action cumulative de l'organisateur normal; ceci est démontré par la comparaison de greffes faites chez l'Axolotl, où l'ectoblaste centrifugé est placé tantôt en position ventrale, tantôt dans le territoire neural présomptif.

TRAVAUX CITÉS

BAGINI, M. (1925). Azione della centrifugazione sullo sviluppo delle uova segmentate di anfibi anuri. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* **22**, 35-83.

BANTA, A. M., & GORTNER, R. A. (1915). Accessory appendages and other abnormalities produced in Amphibian larvae through the action of centrifugal force. *J. exp. Zool.* **18**, 433-45.

BEAMS, H. W., KING, R. L., & RISLEY, P. L. (1934). Studies on centrifuged Frog eggs. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **32**, 181-4.

CHUANG, H. H. (1939). Induktionsleistungen von frischen und gekochten Organteilen (Niere, Leber) nach ihrer Verpflanzung in Explantate und verschiedene Wirtsregionen von Tritonkeimen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **139**, 556-636.

HOLTFRETER, J. (1934). Über die Verbreitung induzierender Substanzen und ihre Leistungen im Triton-Keim. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **132**, 307-83.

— (1944). Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *J. exp. Zool.* **95**, 307-40.

— (1945). Neuralization and epidermalization of gastrula ectoderm. *J. exp. Zool.* **98**, 161-209.

— (1947). Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. exp. Zool.* **106**, 197-222.

— (1948). Concepts on the mechanism of embryonic induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. *Symp. Soc. exp. Biol.* **2**, 17-49.

PASQUINI, P., & REVERBERI, G. (1929). Studi sulla determinazione nello sviluppo degli Anfibi (Analisi sperimentale degli effetti della centrifugazione sui primi stade embrionali di *Rana esculenta*). *Boll. Ist. Zool. R. Univ. Roma*, **7**, 1-55.

PASTEELS, J. (1940). Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenèse chez les Amphibiens anoures. IV. Centrifugation axiale de l'œuf fécondé et insegmenté. *Arch. Biol., Paris*, **51**, 335-86.

SCHECHTMAN, A. M. (1937). Mechanism of anomaly induction in frog eggs by means of the centrifuge. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **37**, 153-54.

TOIVONEN, S. (1940). Über die Leistungsspezifität der abnormen Induktoren im Implantatsversuch bei Triton. *Ann. Acad. Sci. fenn. (A)*, **54** (6), 1-150.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

A-F. Coupe à travers des œufs centrifugés de *Xenopus laevis*. (A) Immédiatement après la centrifugation (coupe verticale); (B) gastrula peu de temps après la centrifugation. Il s'agit d'un stade non sensible: notez l'effacement des plis blastocoeliens. (C) et (D) très jeunes neurulas; (E) neurula moyenne; (F) neurula avancée d'œufs ayant été centrifugés au stade blastula.

PLANCHE 2

A-C. Coupes successives, d'avant en arrière d'un embryon de *Rana temporaria* centrifugé au début de la gastrulation. *Cerv. II*, cerveau secondaire; *Ch. II*, chorde secondaire; *Ep.*, épiphyse; *Med. II*, moelle secondaire; *Myel. II*, myélencéphale secondaire; *Queue II*, queue secondaire; *Plac. II*, placode secondaire; *Som. II*, somites secondaires.

D-F. Détails des organes secondaires d'un embryon de *Rana temporaria*, centrifugé au stade jeune gastrula. *C. ch. incl.*, cellules chordales incluses dans le névraxe; *Ch. II*, chorde secondaire; *Med. II*, moelle secondaire; *Pron. II*, pronéphros secondaire; *Rhomb. II*, rhombencéphale secondaire; *Som. II*, somites secondaires.

G. Coupe à travers un explantat d'ectoblaste présomptif de *Rana temporaria* prélevé immédiatement après la centrifugation; celle-ci ayant été effectuée au stade jeune gastrula.

PLANCHE 3

A-E. Aspects divers de vésicules neurales supplémentaires et d'organes sensoriels après centrifugation de la jeune gastrula d'Axolotl.

F. Embryon d'Axolotl ayant été centrifugé au stade jeune gastrula. Moelle incluse dans le 4^e ventricule.

G-H. Coupe à travers la région oculaire d'un embryon de *Rana temporaria* ayant été centrifugé au stade blastula. Chordalisation partielle de l'œil, au voisinage duquel se trouve un petit otocyste.



A



B



C



D



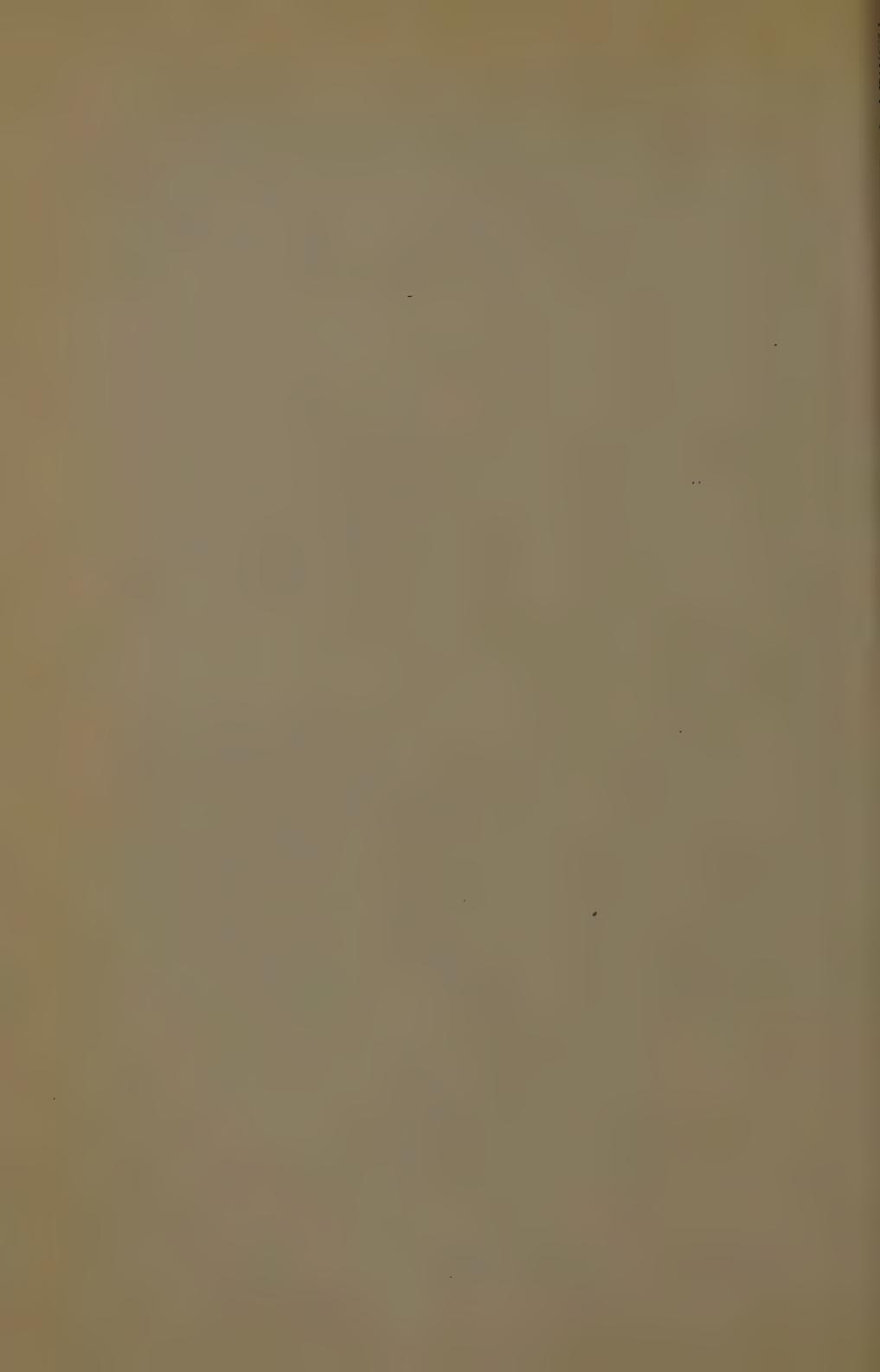
E



F

J. PASTEELS

Planche 1



Distribution of Antigens in the Developing Newt Embryo

by R. M. CLAYTON¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

THE mechanism of differentiation presents one of the central problems of embryology, and it seems reasonable to assume that the development of tissue and organ specificities, in a chemical sense, mirrors differentiation as recognized by the classical methods of embryonic grafting and histological analysis. It is now well established that it is possible, by means of immunological techniques, to demonstrate certain specificities among the organs of adult animals, that is, that organ-specific antigens exist. Conversely, cross-reactions between a number of organ extracts and the antiserum to one organ indicate identity or similarity of some of their antigens (for bibliography see Landsteiner, 1945). The ontogeny of organ antigenic specificity is therefore of interest to the embryologist.

The earlier work has been reviewed by Needham (1942) and Cooper (1946). In more recent work, using refined techniques, a number of antigens similar to or identical with adult antigens have been demonstrated in the embryo. Some of these have been shown to be first detectable at definite stages in embryonic development. The antigenic composition of particular embryonic organs has been analysed by means of antisera to corresponding adult organs. Differences in antigenic composition between embryonic organs have been indicated which may not correspond to those existing between their adult counterparts. Finally a number of antigens have been shown to be characteristic of the embryo or foetus only, being absent in the adult.

The present author is not aware of any attempt to analyse the spatial distribution of antigens in an embryo before the stage of organogenesis. An attempt has been made, therefore, to investigate the earliest stages of morphogenesis in an embryo whose dissection might prove relatively easy and large numbers of which were available. The embryo of *Triturus alpestris* was accordingly chosen for this purpose.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Antigens

Embryos of *Triturus alpestris* were freed of the vitelline membrane in sterile conditions and were either homogenized entire or dissected to provide particular tissues

¹ Author's address: Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh, 9.

for homogenization. The following breis were used without further treatment as antigens for injection: (1) Early gastrulae (crescent-shaped blastopore, averaging 50 per injection, according to quantity available). (According to Gregg and Ballentine, 1946, there is 12 mg. of protein in 50 *Rana* eggs.) (2) Tail-bud stages (30 per injection). (3) Ectoderm of the early yolk plug gastrula (100 per injection). (4) Archenteron roof of the early yolk plug gastrula (100 per injection). The following breis were made to provide antigen solutions for testing: (1) Blastulae, 20 per c.c. (2) Gastrulae (as above), 20 per c.c. (3) Neurulae (neural groove stage), 20 per c.c. (4) Tail bud, 20 per c.c. (5) Archenteron roof (as above), 100 per c.c. (6) Ectoderm (as above), 100 per c.c. (7) Neural plate (open neural plate), 50 per c.c. (8) Neurula ectoderm (ectoderm of open neural plate stage), 50 per c.c.

In the separation of gastrula archenteron roof and ectoderm great care was exercised to ensure the rigorous exclusion of cells from other layers. Those areas where considerable stickiness or looseness of the mesoderm made clear separation uncertain or over-laborious were discarded. It is certain, however, that the removal of underlying mesoderm was not complete in the preparation of the neural plate and neurula ectoderm homogenates and this must be taken into consideration when evaluating the results. All homogenates, whether for injection or testing, were made in sterile conditions, in ice-cold, full-strength Holtfreter's solution buffered with phosphate to pH 7.4. In the 1949 season they were prepared by grinding with a glass rod in a sterile tube containing chemically clean sand, in subsequent seasons in a Ten Broek homogenizer. The homogenates were injected fresh without centrifuging. Antigen solutions for testing or absorptions were centrifuged in an angle centrifuge for 10 minutes at 3,500–4,000 r.p.m. and the fatty material which was spun to the top was removed with sterile cotton-wool; by careful pipetting and a second (or very occasionally a third) brief spin in fresh tubes, a clear, very faintly opalescent solution was obtained which was used fresh for absorptions and tests. The salinity was increased before testing in order to avoid non-specific precipitates or inhibitions. Nevertheless, whenever comparisons were made between results in 0.9 per cent. saline and Holtfreter's solution, no differences were observed.

Antisera

Rabbits were tested before being chosen for a course of injections and a number found which had weak but definite precipitins for the newt; these were rejected. The freshly prepared antigen was injected into the marginal ear vein at intervals depending on the supply of eggs, usually every 3 days. Generally a course of 10–12 injections was required before a workable antibody was obtained, which even then tended to be low in titre, titres ranging from 80 to just over 1,000. Altogether, six rabbits were used to produce anti-gastrula antiserum, two for anti-ectoderm antiserum, two for anti-mesoderm (archenteron roof) antiserum, one for anti-tail bud antiserum, and five were used as controls. No anaphylaxis ever occurred. Rabbits were bled from the marginal ear vein to provide blood for preliminary tests, otherwise from the median ear artery or by cardiac puncture. Sera were stored in the refrigerator and used within a fortnight.

Absorptions

All antisera reacted both with homologous and heterologous material, the titre of any antiserum being lower for heterologous than for homologous extracts derived

from homogenates containing approximately equal volumes of solid matter. After absorptions, the titres for homologous material frequently dropped considerably, often tenfold, but sometimes apparently rose, both for heterologous and homologous material. This apparent anomaly may possibly be explained by a finding to be discussed below.

In view of the general tendency to a drop in titre, it was preferred to start absorptions with undiluted antisera, or antisera not diluted more than four times; although the point of optimal proportions could not be clear, since it was never found possible to produce an antigen solution so concentrated as to be in the region of antigen excess. An antigen solution of 20 gastrulae per c.c., for example, was in the region of excess only for a serum dilution of $\frac{1}{8}$ and more. In practice, the heaviest precipitate was to be found in the tube producing the densest ring in the shortest interval of time. After half an hour at 37° (or in a few cases about 8 hours at room temperature) the tubes were left for 24 hours in the refrigerator and then centrifuged. The supernate was found to contain both antiserum and antigen excess: one or two further absorptions generally removed activity for the absorbing material. It was found not practicable to absorb by more than two heterologous tissues as the antiserum became extremely weak, and the rings produced very faint. It was sometimes observed that after the preliminary absorption the supernate was apparently negative for both excess antibody and excess antigen. If, however, a further aliquot was added, a positive reaction occurred. It is assumed that this indicates that different antigenic fractions are present in vastly different concentrations or effective concentrations, some being in the region of antigen excess during the first absorption, requiring the addition of two further aliquots of antiserum to produce a precipitate, while others require to be present in concentrations corresponding to considerable antigen excess of the main constituents. A rare antigen present in both homologous and heterologous tissue might remain undetected until the addition of further quantities of extract during absorption, thus causing anomalous increases in titre over a certain range. In fact, after removal of the precipitate in the anomalous tubes, the titre was found to have dropped for homologous material as described earlier. It is thought possible that such factors may account for some of the cases of apparent loss of absorption on further testing which have been reported from time to time.

Over a sufficiently wide range of dilutions most sera showed two optimal zones, of which that in the more dilute antigen was the slower with the smaller precipitate. A prozonē usually occurred.

Tests in vitro

The clear antigen solutions were used for interfacial precipitin tests in tubes of internal diameter 0.5 cm. or 0.25 cm. in which a measured quantity of antigen was placed above an equal or greater quantity of antiserum. The standard concentration of antigens found to be suitable were those already described.

Antisera and antigen solutions were diluted in powers of 2 or of 10. After stoppering the tubes with sterile wool or sterile caps, they were left at room temperature and readings taken at 5- or 10-minute intervals for 30 minutes, hourly for 6 hours, and finally the following day, after having been left in the refrigerator overnight. The tubes were examined by transmitted light against a black background. Rapid reactions frequently took over 5 minutes to develop, and some, particularly those involving partially

absorbed antisera, did not develop until the following morning. If the quantities of anti-serum and antigen had been equal, the contents of the tubes were mixed and after a further interval of from an hour to a day, depending on the speed of appearance of the ring, centrifuged for 5 minutes at 4,000 r.p.m. in an angle centrifuge and a final reading taken of the precipitates. This served as a check for weaker ring tests, and if the shortage of extracts was acute, the tubes in the optimal region were regarded as constituting a first absorption. Although some of these reactions were slow, since the tubes and their contents were sterile and were kept covered or plugged, it is most unlikely that any of the slow-developing precipitates were due to bacterial changes.

It was found in a small number of tests that the use of anti-serum in 5 per cent. gelatine made it possible to read exceedingly weak positives which might otherwise have been missed or dubious, since under the binocular, or even with the naked eye, a fine scattered precipitate could be observed resting on the surface of the gelatine. Tubes containing anti-serum in gelatine were not kept long enough to observe the development of any rings. Tests according to the technique of Oudin (1948a, 1948b) will be described in a later paper. It might be mentioned here, however, that except where rings were very dense, or after double absorptions when they were very weak, it was frequently observed that from two to four rings developed in the ordinary interfacial tests; these were normally different in width and intensity and after a few hours either disappeared or settled to the bottom of the tube.

Experiments in vivo

Explants or embryos at the earliest blastula or gastrula stages were put up in culture media containing normal serum or anti-serum, the complement of which was destroyed by heating to 56° C. (It was found that embryo extracts fix complement. This property, incidentally, rendered the complement-fixation test quite unsuitable.) The serum or anti-serum was diluted with distilled water to provide the same saline concentration as diluted (1/10) Holtfreter's solution. Theoretically 1 part of serum in 2½ of water is approximately osmotically equivalent to full-strength Holtfreter. This was confirmed by a few tests against sucrose solutions in a thistle-funnel type osmometer. Explants were occasionally put into a medium containing 1 part serum in 2½ of water, or 1 in 5, and transferred to the weaker solution after half a day. In the dilution of absorbed antisera, allowance was made for the quantity of antigen solution already added.

A limited number of cultures were made in small Petri dishes in the standard manner; but the majority were put up singly into tubes of ½ in. diameter, which had been half-filled with agar and were stoppered with cotton-wool. The extremely small quantities of absorbed or partially absorbed antisera available at any one time made this procedure necessary, and it was, therefore, generally adopted, even where large quantities of unabsorbed antisera were available. No difference between embryos cultivated in tubes and Petri dishes was observed. Cultures were kept at room temperatures.

An archenteron roof normally provided from one to two isolates, and the ectoderm of a gastrula two to three.

Sterile technique was observed throughout; bottling, transference, and dilution of sera and the setting up of embryonic material were done in a room sterilized by ultra-violet lamps. Binocular examinations were made at daily intervals, and any culture recorded as dead in which there was any trace of cloudiness, either in the medium or round the egg itself, was tested for bacterial infection by Gram-staining a film. A

negligible number of infections were, in fact, found; infected cultures were not included in the classification of results.

RESULTS

Precipitin tests

1. *Antisera to gastrulae.* Of the six rabbits used to produce antiserum against gastrulae, only three produced antisera with titres between 128 and 1,000; only these three animals were used at all extensively. In all cases the serum end-point was higher for gastrula antigens than for blastula antigens obtained from homogenates of equal numbers of eggs per c.c.

These antisera absorbed with blastula antigens were tested against gastrula and blastula extracts in fifty separate tests run in duplicate. In twenty-six of these absorption was found to be incomplete (in that weak, slow-developing positive reactions occurred with blastula extracts); nevertheless the difference in intensity and time to develop of the ring, as between heterologous and homologous antigens, was clear, indicating that one aliquot of blastula antigens was not equivalent to one of gastrula antigens. In twenty-four duplicate tests absorption was complete; these sera, now negative for blastula extracts, were all positive for gastrula extracts.

This is taken to indicate the existence of an antigenic fraction in the gastrula which cannot be detected in the blastula and which either comes into existence or is suddenly synthesized in measurable quantities between the late blastula and early crescent-shaped gastrula stages (fraction *X* in Table 4). Additional confirmation was provided by the serum of one of the animals which consistently showed one optimum with blastula extracts, two optima, and a prozone with gastrula extracts.

2. *Antiserum against the tail-bud stage.* Only one rabbit was used to produce this antiserum, which had a titre of a little under 1,000. It reacted positively with blastula, gastrula, and neurula.

TABLE 1
Anti-tail bud stage antiserum

Tested against	Absorbed with	
	Gastrula	Neurula
Gastrula	+	—
Neurula	+	—
Tail bud	+	+

The following tests were run in duplicate:

- Absorbed with gastrula, tested against neurula and tail bud.
- Absorbed with neurula, tested against tail bud.

Seven absorptions of anti-tail bud with gastrula and four with neurula were set up; in two cases of each type absorption was found later to have been

incomplete. The results in Table 1, therefore, represent tests performed with five complete absorptions by gastrula and two by neurula.

These tests, since they are few in number, require to be repeated. They would seem to indicate, however, that a new antigenic fraction arises between gastrulation and neurulation and another between neurulation and the tail-bud stage (fractions *Y* and *Z* in Table 4). This test cannot, of course, indicate whether these fractions consist of more than one component.

3. Antiserum against ectoderm and antiserum against mesoderm (archenteron roof). Both antisera against ectoderm and against mesoderm gave positive reactions with all extracts tested; that is, with blastula, gastrula ectoderm, gastrula

TABLE 2
Anti-ectoderm antiserum

Tested against	Absorbed with									
	<i>B</i>	<i>M</i>	<i>B and M</i>	<i>NP</i>	<i>NE</i>	<i>NP and B</i>	<i>NE and B</i>	<i>NP and M</i>	<i>NE and M</i>	
Blastula	0 (20)	7 (7)	0 (8)	—	—	0 (5)	0 (2)	—	—	
Mesoderm	12 (13)	0 (21)	0 (8)	2 (2)	—	—	—	0 (6)	0 (2)	
Ectoderm	15 (15)	21 (21)	5 (5)	—	—	—	—	—	—	
Neural plate	11 (11)	9 (10)	7 (7)	0 (8)	12 (12)	0 (5)	2 (2)	0 (6)	1? (2)	
Neurula ectoderm	9 (9)	9 (9)	?	8 (1)	0 (8)	5 (12)	0 (5)	0 (2)	6 (6)	
Complete absorptions tested	(20)	(21)	(8)	(8)	(12)	(5)	(2)	(6)	(2)	

Key: *B*, blastula; *M*, mesoderm; *NP*, neural plate; *NE*, neurula ectoderm. For further explanation see text.

mesoderm, neural plate, and neurula ectoderm. The results of testing antisera against ectoderm and antisera against mesoderm absorbed by different antigens are set out in table form. As above, only those tests in which absorption was complete are set out in the tables; tests during the course of which it appeared that absorption had been incomplete but which gave strong reactions for heterologous extracts, weak for homologous, are not included. Tests were run in duplicate. The figures in each column in Tables 2 and 3 represent the number of pairs of tests which gave positive results. The number in brackets represents in each case the number of completely absorbed antisera which were tested. The figures in the row 'Complete absorptions tested' represent the total number of separate samples of absorbed antisera which were divided up for a few of the total range of tests in each column.

The absorptions with blastula, ectoderm, or mesoderm demonstrate the existence of the following antigenic fractions:

- (1) The *C* or common group. A fraction common to ectoderm and mesoderm (archenteron roof) of the early gastrula. Part of this fraction is to be found in the blastula (*C*) and part arises after gastrulation (*C*¹).
- (2) The *E* or ectoderm group. A fraction specific to ectoderm as distinct from mesoderm. Part of this fraction is to be found in the blastula (*E*) and part arises after gastrulation (*E*¹).
- (3) The *M* or mesoderm group. A fraction specific to mesoderm as distinct from ectoderm. Part of this fraction is to be found in the blastula (*M*) and part arises after gastrulation (*M*¹).

TABLE 3

Anti-mesoderm antiserum

Tested against	Absorbed with				
	<i>B</i>	<i>E</i>	<i>B and E</i>	<i>NP</i>	<i>NE</i>
Blastula	0 (10)	4 (5)	0 (7)	—	—
Mesoderm	9 (9)	15 (15)	3 (3)	—	—
Ectoderm	9 (9)	0 (20)	0 (7)	—	—
Neural plate	2 (2)	7 (8)	2 (3)	0 (2)	3 (3)
Neurula ectoderm	2 (2)	10 (11)	7 (7)	2 (2)	0 (3)
Complete absorptions tested .	(10)	(20)	(7)	(2)	(3)

Key: *B*, blastula; *E*, ectoderm; *NP*, neural plate; *NE*, neurula ectoderm.

The absorptions with neural plate or neurula ectoderm, combined or uncombined with blastula or other extracts, indicate the existence of the following fractions:

- (1) A fraction of the antigens present in the ectoderm of the early gastrula which are found in neurula ectoderm as distinct from neural plate (*N* group).
- (2) A fraction of the antigens present in the ectoderm of the early gastrula which are found in the neural plate as distinct from the neurula ectoderm (*P* group).
- (3) Antibodies to the group *E* antigens (i.e. anti-ectoderm absorbed with mesoderm) react with antigens of both neural plate and neurula ectoderm. When the antibodies to the *N* group (i.e. anti-ectoderm absorbed with neural plate) are further absorbed by mesoderm, they are still capable of reacting with neurula ectoderm; when antibodies to the *P* group (i.e. anti-ectoderm absorbed with neurula ectoderm) are further absorbed by mesoderm they still reacted in one very weak duplicate test with neural plate. This suggests, although it cannot be conclusive, that the *E* group segregates as between neural plate and neurula ectoderm, some part of the ectoderm-specific antigens being found in neural

plate and a different part in the neurula ectoderm. Absorption by blastula and mesoderm indicates the presence of E^1 in neural plate and perhaps in neurula ectoderm. Hence either neural plate contains E^1 and neurula ectoderm E and E^1 , or the E^1 fraction is complex.

Absorption by neurula ectoderm lowers the titre of an antiserum considerably more than does absorption by neural plate. Two consecutive absorptions including neurula ectoderm lowered the titre for homologous material to 10 or less. This suggests that the antigens found in neurula ectoderm represent either the greater number of those present in ectoderm, or those present in higher concentration, or those which are good antigens, while neural plate contains a smaller number, lower concentration or weaker antigens as the case may be.

(4) There are pre- and post-gastrulation components of N group; N and N^1 .

(5) This may be true also of the P group, but the difficulty arising from double absorption including neurula ectoderm mentioned above occurs here, so that it is not clear from these tests whether there is a post- as well as a pre-gastrulation fraction.

(6) The P and N groups may well hold a number of antigens in common, but this cannot be shown by the above tests. The location of those antigens arising during neurulation, i.e. fraction Y , as between these two tissues, is not yet known.

(7) The antibodies to the M group react with both neural plate and neurula ectoderm. It was pointed out in the section on methods that neither neural plate nor neurula ectoderm was wholly freed of adherent mesoderm and it is therefore likely that this result is merely a reflection of this contamination. The quantities of mesoderm present as contaminant and the quantities of mesoderm required in a stock antigenic solution are very different. However, if we make the assumption that no part of the M group of antigens (mesoderm-specific) is to be found in the ectodermal derivatives of the neurula, then the C group must also segregate as between neural plate and neurula ectoderm; i.e. the P group contains part of the C group and part of the E group while the N group contains a different part of the C and E groups respectively. Since neural plate contains E^1 (as shown by anti-ectoderm absorbed by archenteron roof and blastula), neurula ectoderm must contain C^1 (anti-ectoderm absorbed by neural plate and blastula). Therefore neural plate must contain C (absorption of anti-mesoderm by neurula ectoderm). Whether C is also in neurula ectoderm cannot be shown.

Two points emerge from these results: (i) A tissue-specific antigen may be detected before the differentiation of that tissue (E , M , P , and N). (ii) Antigens which later are confined to particular tissues may coexist in an earlier tissue (E and M , P and N).

The following provisional scheme (Table 4) shows in diagrammatic form the behaviour of the antigens as at present envisaged.

One final point might be mentioned here, concerning the anomalous behaviour of neurula ectoderm solutions.

On one or two occasions tubes had been left for a longer period of time than

was customary and, although readings had been completed, they were examined again before being discarded. On each of these occasions it was noted that certain absorbed antisera layered with the absorbing antigen, which had remained negative for 24 to 36 hours, were showing positive reactions, i.e. broad interfacial

TABLE 4

BLASTULA	GASTRULA	NEURULA	TAIL-BUD
ECTODERM	$C C^! E E^!$	Neural plate $E^! C$ part of $C^!$?	
MESODERM	$C E M$	Neurula Ectoderm $E C^!$ part of C & $E^!$?	
UNALLOCATED	X consists of $C^! E^! M^!$ and perhaps others	Y not further studied	Z not further studied

bands in the area of the original interface. Tests were after this deliberately left for a longer period, and the same phenomenon was observed. At first it was thought that slight evaporation might have changed the concentration of some exceedingly rare antigen and was bringing it up to a threshold. A small number of tubes, therefore, were covered with a layer of sterile paraffin, in spite of which the same changes occurred. As this phenomenon was not observed until late in the 1951 season, it has been neither investigated nor fully confirmed by a large number of tests. It is considered that the positive reaction is due not to a long-delayed precipitin reaction (36 hours and over is rather a long time for such a reaction) but to the conversion of some or all of the neurula ectoderm antigens (group N) to some fraction specific to neural plate (P group) for which these neurula ectoderm absorbed antisera were positive. Some slow enzymatic breakdown or perhaps denaturation may be responsible for such a change, and the possibilities will be investigated in a subsequent season.

Altogether, some sixteen cases were observed involving neurula ectoderm and four involving a possible similar transformation of ectoderm to archenteron roof.

Woerde man (1950) in a preliminary report states that antigenic extracts of

competent head ectoderm and eye cup, when mixed and allowed to stand, became positive for antilens antisera although the individual components remained negative.

EXPERIMENTS *IN VIVO*

A total of 760 eggs or explants were put up into normal sera, antisera, and absorbed antisera. An embryo or explant was scored as dead if it possessed any of the following features:

1. The upper part of the cells was translucent, as in ageing, unfertilized eggs; this phenomenon was sometimes combined with an uneven distribution of pigment (see Plate, fig. A and B).
2. The colour was a pale cream-grey and the tissues soft to the touch.
3. Specimens were collapsed or disintegrated.

An egg was classified as retarded in development if it possessed any of the following features:

1. The exhibition of miscellaneous anomalies closely resembling different degrees of exogastrulation; thus there might be partial extrusion of the yolk plug, and the lateral lips of the blastopore might be incomplete or absent. The dorsal lip was sometimes overgrown (Plate, fig. C). Sometimes there was a general tendency to slow development, so that even with some invagination in the dorsal plane there was little or no sign of the formation of a neural plate 3 days after the onset of gastrulation, at which time control gastrulae of the same age were at the neural groove stage.
2. A blastopore that remained as a depression or slight pit without invagination at all for the 2 or 3 days for which the egg survived (Plate, fig. B).
3. The presence of abnormally large cells; blastula-sized cells might appear in a gastrula with inhibited blastopore.

In sectioned material, almost without exception, eggs scored as dead showed (if they had not already totally disintegrated) few mitotic figures or none, and signs of cytolysis either in a local area or widespread. Occasionally the contents of the cell appear to be precipitated at one side instead of being evenly distributed (Plate, fig. D). This cannot be due to uneven fixation as all eggs, control and experimental alike, were fixed by dropping into a tube of Bouin's fluid and the phenomenon was not observed in control eggs. Staining was with haematoxylin and eosin; and it was frequently observed that nuclei were colourless while the cytoplasm stained with haematoxylin, which did not occur in controls (Plate, fig. E).

The results given in Tables 5 and 6 show (1) that diluted normal sera are not as good a medium for embryos as Holtfreter's solution, (2) a significantly larger number of embryos and explants die in antisera than in control sera ($\chi^2 = 87.1^{**}$).

The effects obtained with antisera are extremely variable, and a certain number of embryos are totally unaffected by antisera. Any attempt to evaluate the

results must take these into consideration. There are a number of possible explanations: (a) The medium was not fully toxic because the absorbed antisera often had a titre of between 20 and 100. They were then at the end of their range in the culture medium. (This is non-specifically offset by the fact that the antigen

TABLE 5

Comparison of effects of antiserum and control serum

Medium	Material	Dead	Alive	Total
Holtfreter's solution . .	{ Blastula Gastrula Ectoderm Archenteron roof }	8	72	80
Control serum . .	{ Blastula Gastrula Ectoderm Archenteron roof }	19	80	99
Anti-gastrula Anti-ectoderm Anti-mesoderm }	{ Blastula Gastrula Ectoderm Archenteron roof }	132	38	170

TABLE 6

The behaviour of whole embryos in antisera

Medium	Absorbed	Material	Dead	Alive	Total abnormal	Total
Holtfreter's solution . .	—	{ Blastula Gastrula }	2	43	—	45
Anti-gastrula . .	—	Gastrula	36 (1)	16 (5)	6	52
" . .	Blastula	Gastrula	17 (2)	10 (5)	7	27
" . .	—	Blastula	47 (4)	6 (1)	5	53
" . .	Blastula	Blastula	45 (12)	13 (7)	19	58
Control serum . .	—	{ Blastula Gastrula }	2	50	—	52
" . .	Blastula	{ Blastula Gastrula }	3	34 (4)	4	37

Figures in brackets represent embryos showing morphological abnormalities.

extracts were themselves deleterious to some extent when added to a medium containing normal serum or Holtfreter's solution.) (b) There was undoubtedly genetic diversity in the material. (c) It is quite possible that different stages have different sensitivities and it was not possible to ensure that all members of a group were at the identical point of development, although they would have been quite similar morphologically.

The average chance of survival of an embryo in diluted normal serum is 96 per cent. The average chance of survival of a blastula in anti-gastrula antiserum is 11 per cent., that of a gastrula 31 per cent. Thus a blastula is actually almost three

times more susceptible than a gastrula to the deleterious effects of anti-gastrula antiserum, and the difference is significant ($\chi^2 = 6.04^*$). This characteristic must be due to some difference in the cell surface or to a difference in the location of antigens irrelevant to their relative total antigenic constitutions. Survival is 92 per cent. in normal serum with added embryo extract (i.e. supernate from centrifuged brei, as used for absorptions and interfacial precipitin tests). Anti-gastrula antiserum absorbed with blastula gives gastrulae a chance of survival of 37 per cent., which is not significantly different from that of gastrulae in unabsorbed antisera ($\chi^2 = 0.316$). The chance of survival of blastulae in anti-gastrula antiserum absorbed with blastula is not significantly greater than that in unabsorbed antisera ($\chi^2 = 2.43$); but over a quarter die on the point of gastrulation, while of those surviving, half showed abnormal or inhibited gastrulation. This suggests that the partially absorbed antiserum is less toxic than the unabsorbed and that such toxicity as is left is relatively stage-specific; and that the death or abnormal development of blastulae in anti-gastrula serum absorbed with blastula is due to antibodies left in the medium after removal of antibodies to blastula antigens, i.e. that at gastrulation a new fraction appears.

TABLE 7

Serum	Absorbed	Material	Dead	Alive	Total
Anti-mesoderm	—	E M}	44	16	60
Anti-ectoderm	—	M			
Control	—	E M}	16	21	37
Anti- <i>X</i>	Y	X	21	4	25
Anti- <i>X</i>	Y	Y	13	12	25

It will be noted that the proportion of total abnormalities to total numbers is about 3 or 4 times higher in partially absorbed than in unabsorbed antisera, the difference being significant ($\chi^2 = 12.24^{**}$). The control figures suggest that little or none of this effect may be attributed to the addition of embryo extract (for the numbers of abnormal embryos in control serum with and without embryo extract, $P = 0.069$ by Fisher's exact test); most therefore must be due to the lessened toxicity of the weakened antiserum.

A small number of explants of archenteron roof and gastrula ectoderm were put up into anti-mesoderm and anti-ectoderm antisera and into partially absorbed antisera (Table 7). In control sera the survival chance is 57 per cent. This is considerably lower than that for whole embryos. The survival rate in either anti-serum is 27 per cent. Ectoderm explants are about twice as likely to survive as archenteron roof explants.

Since so few explants were made into partially absorbed antisera, the figures have been summed into the following classes:

1. Tissue *X* in anti-*X* absorbed with *Y*, i.e. ectoderm in anti-ectoderm ab-

sorbed with mesoderm, or mesoderm in anti-mesoderm absorbed with ectoderm.

2. Tissue *Y* in anti-*X* absorbed with *Y*, i.e. ectoderm in anti-mesoderm absorbed with ectoderm, or mesoderm in anti-ectoderm absorbed with mesoderm.

The percentage survivals are 16 and 48 per cent, respectively; this difference between the two classes is significant ($\chi^2 = 5.88^*$). Thus homologous tissue in heterologously absorbed antisera has a survival chance lower but not significantly so than that in unabsorbed antisera ($\chi^2 = 1.14$). Heterologous tissue in heterologously absorbed antisera has a survival chance lower but not significantly so than that in normal serum ($\chi^2 = 0.14$).

DISCUSSION

Tests in vitro

The earlier experiments designed to detect antigens in the embryo which were capable of cross-reacting with antisera to preparations of the adult organism—many of which yielded entirely negative results—have been reviewed by Needham (1942), Loeb (1945), Cooper (1946), and Schechtman (1947). More recently, Burke *et al.* (1944) and Cooper (1948) found evidence in the chick and frog embryo respectively for the presence of such antigens in the embryo although earlier experiments on the same material had proved negative. Cooper has demonstrated the presence of adult serum-like antigens even in the uncleaved egg. The evidence which Burke *et al.* present suggests that some adult specificities are acquired earlier than others and that transitory specificities occur, for example in the ontogeny of the lens. This latter point is not confirmed by ten Cate & van Doorenmaalen (1950), who used techniques which seem to be preferable to those employed by the earlier authors. Schechtman (1947, 1948) and Nace & Schechtman (1948) have found serum-like antigens in the primitive streak stage of the chick; since after absorption of the antiserum by yolk he was unable to obtain positive reactions except with the blood of the 15-day chick and the organs and blood of the 19–20-day chick, he has suggested that it is the intracellular yolk which is responsible for the earlier positive reactions. Ebert (1949, 1951) has studied the chick by means of antisera to adult heart, brain, and spleen, and found that antigens common to spleen and brain and heart and brain respectively are found in the spleen and heart of the 9-day embryo but in the brain of the 18-day. Antigens specific to heart, brain, and spleen respectively may be found in the 9-day embryo and an additional spleen-specific factor in the 18-day embryo. Maculla (1948 *a, b*), employing the complement-fixation test on unabsorbed antisera to various fractions of organs of the adult mouse, finds that adult liver extracts showed low reactivity with the various antisera employed, while adult spleen showed a high cross-reactivity. The reverse was the case with extracts of embryonic liver and spleen respectively, embryonic liver showing high cross-reactivity and spleen low. The age of the embryos is not given.

Much less work has been done in which embryonic antigens have been employed to manufacture antisera. Of recent work, Cooper (1948) demonstrated the antigenicity of the eggs of *Rana pipiens* when used in sufficient doses, and Perlman & Gustafson (1948) demonstrated that a new antigenic fraction may be detected at gastrulation in *Paracentrotus lividus* by means of antisera to the gastrulae absorbed with blastula extract. Lithium treatment did not prevent this antigenic change. By employing Oudin's technique, Cooper (1950) has estimated the number of antigens shared by the *Rana* egg and neurula, egg and adult serum, neural plate and adult serum. Her data do not, however, permit one to judge whether new antigens may be detected during ontogeny. Localized accumulation of ribose nucleic acid, indicating protein synthesis, is shown by Brachet (1944) to occur in the amphibian gastrula and neurula. Hoff-Jørgensen & Zeuthen (1952) report that they have evidence of bursts of synthesis of cytoplasmic desoxyribosides to the frog egg at the onset of gastrulation and again during neurulation. The evidence given by the present author of new antigens detectable at these stages is, therefore, not at variance with other evidence of synthetic activity in the amphibian egg.

An important paper by Flickinger & Nace (1952), which appeared while this article was in press, demonstrates the synthesis of two antigenic fractions before the tail-bud stage and describes the effect of anti-tail bud stage antisera *in vivo*.

Ebert, ten Cate & van Doorenmaalen, and the present author have noted that increasing numbers of embryos are required to provide material for a given test as the embryos decrease in age. This may indicate nothing more than increase in total bulk and dry weight of the embryo, but in the experiments of ten Cate and van Doorenmaalen it seems likely that a factor of significance must be the change in the relative qualities and the availability of lens-specific protein.

Any system of absorptions and tests employed is selective in that only certain patterns of antigenic behaviour can be determined. Thus the occurrence in tested tissues of new antigens at various stages may be detected, if present, by the testing of antiserum against an older stage absorbed by extracts from a younger stage. It is necessary to absorb antisera to younger tissues by extracts from older ones to determine whether antigens of transitory existence in the egg as a whole are to be found, or whether an early tissue has a particular fraction not to be found in its derivatives. Such tests have not been made in the course of these experiments. Similarly cross-reactions have not been sought for between these embryonic tissues and given adult ontogenetic derivatives. It was felt that since it is possible that many adult tissues may contain antigens of limited distribution in the embryo and vice versa, many embryonic organs may share an antigen of limited distribution in the adult; the relationships between embryonic antigens themselves would be more readily followed by employing the more tediously prepared antisera to the embryonic material.

A pattern of segregation of antigens has been suggested, that is, that antigens *E* and *M* later characteristic of ectoderm and mesoderm respectively coexist in

the blastula, and E^1 , E , C , and C^1 coexist in gastrula ectoderm but are found separated in neural plate and neurula ectoderm. The converse phenomenon, that of the coexistence in a tissue of two antigens previously specific to different tissues, has not been demonstrated (unless the presence of the M antigens in neurula ectoderm or neural plate is *not* due to contamination), but again it is possible that a different system of tests might have brought out more clearly behaviour of this type, if it exists.

The pattern of development of an embryo may—very provisionally—be visualized as involving the following phenomena: the synthesis—whether from traces or *de novo*—at different stages of new antigenic material, some of which may be transitory, such as foetal haemoglobin, and some of which may remain in the organism; some adult antigens, however, may be found as early as in the fertilized or unfertilized egg; some of these may have been directly derived from the maternal organism. (These data have been reviewed by Cooper, 1946 and 1948.) An antigen may be specific to a given organ or tissue (lens protein, ten Cate & van Doorenmaalen; spleen-specific antigen, Ebert; fractions N and P , the present author) or they may be common to several organs but be synthesized at different times in these (the heart-brain and spleen-brain antigens, Ebert; perhaps the M group, the present author). In addition, as development proceeds and a labile tissue moves along different paths of differentiation, other phenomena may occur; the apparent segregation of some antigens corresponding to the tissue segregation (antigens E and M , N and P , the present author); Maculla's data suggest that the last two phenomena occur in her material.

Finally, the relative and absolute quantity of a given specific antigen may increase enormously as morphogenesis proceeds, as in lens and presumably in muscle.

Cultivation in vivo

The effects of antisera *in vivo* and in tissue culture are referred to in an extensive literature and may, apparently, be classified under the following headings: (1) generally cytotoxic, (2) generally inhibitory, (3) specifically cytotoxic, (4) specifically inhibitory, (5) specifically stimulatory, (6) without effect. The following refers to *embryonic* tissues.

General inhibition of growth has been reported by Weiss & Campbell (Weiss, 1947) and, for certain dilution ranges only, by Ebert (1950). General cytotoxic effects are reported by Ebert for higher concentrations of the same antisera. Specific inhibition is claimed by Ebert for dilutions intermediate between the generally cytotoxic and generally inhibitory ranges. Specific cytotoxic effects are reported by Burke *et al.* (1944), who claim that antilens antiserum caused lens damage in the chick embryo between 146 and 192 hours only. Specific stimulatory effects (in association with the general growth inhibition) are reported by Weiss (1947).

In the present work some possible reasons for the variable results (the resistant

eggs, for example) are suggested in the section on results; these include genetic diversity both of antigen and antibody sources, and partial exhaustion of an antiserum; the latter factor is shown to be at least partly responsible for the proportion of abnormal embryos in absorbed antisera. Generally speaking, both cytotoxicity and inhibition have been noted. It is not possible to say whether the exaggerated dorsal blastopore lips sometimes observed were due to generally distorted and abnormal growth or were sporadic cases of genuine stimulation.

A number of factors clearly must be involved in the interaction between an antiserum and an intact cell or tissue. Leaving aside the question of *in vivo* effects, which may well be complicated by factors not immediately relevant, the effect in cultures of tissues or embryos may depend on the source of antibody; dilution of antiserum by the medium relative to its serum end-titre; location of the relevant antigens; surface permeability of the cells and finally, perhaps, as seems for example to occur in the present experiments, the existence of relatively susceptible and resistant phases.

SUMMARY

1. Evidence is presented that a synthesis of antigenic material occurs in *Triturus alpestris* between the blastula and gastrula stage, before neurulation, and between neurulation and the formation of the tail-bud.
2. During early morphogenesis and well before organogenesis the tissues exhibit a lack of antigenic uniformity.
3. The behaviour of six antigenic fractions found in the gastrula have been studied both in their ontogeny and distribution up to the stage of the neurula. Three of these are to be found only after gastrulation. Ectoderm and archenteron roof contain fractions specific to themselves as well as containing some antigens in common. The ectoderm and neural plate of the neurula have some specificity relative to each other.
4. An antigenic fraction specific to a given tissue type may be detected at a stage earlier than that at which this tissue first appears.
5. Two antigenic fractions later characteristic of distinct tissues may coexist in their common precursor.
6. A possible case of *in vitro* antigenic transformation is described.
7. Antisera exhibit an irregularly cytotoxic effect when used in culture media. Partially absorbed antisera tend to cause abnormalities rather than death of whole embryos.
8. There are indications that a certain degree of specificity in action of absorbed antisera occurs when used in culture media. Such specificity is more definite in the case of isolates of ectoderm and archenteron roof.
9. A difference is found between the susceptibilities of blastulae and gastrulae to antisera which cannot be attributed to their difference in antigenic constitution but must depend on a change in the location of certain antigens or a change in permeability.

ACKNOWLEDGEMENT

Grateful acknowledgement is made to Professor C. H. Waddington for the generous provision of facilities in his department and for his frequent encouragement; and to Dr. R. A. Beatty, Mr. N. A. Mitchison, Dr. J. H. Sang, Mr. W. Sobey, and Professor C. H. Waddington for reading and invaluable detailed criticism of the manuscript. My thanks are also due to Mr. D. Pinkney for the photographs, Miss E. Paton and Miss M. Fraser who at different times have rendered technical assistance, to Miss N. Gray for translation of a number of papers, and Miss S. Dare-Delaney who has patiently dealt with the manuscript in its various stages.

REFERENCES

BRACHET, J. (1944). *Embryologie chimique*. Paris: Masson et Cie.

BURKE, V., SULLIVAN, M. P., PETERSEN, H., & WEED, R. (1944). Ontogenetic changes in antigenic specificity of the organs of the chick. *J. infect. Dis.* **74**, 225.

TEN CATE, G. (1950). Orgaan specifieke Antigenen in de Embryonale Aanleg van de ooglens. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **94**, 29.

— & VAN DOORENMAALEN, W. J. (1950). Analysis of the development of the eye lens in chicken and frog embryos by means of the precipitin reaction. *Proc. Acad. Sci. Amst.* **53**, 3.

COOPER, R. S. (1946). Adult antigens (or specific combining groups) in the egg embryo and larva of the frog. *J. exp. Zool.* **101**, 143.

— (1948). A study of frog egg antigens with serum-like reactive groups. *J. exp. Zool.* **107**, 397.

— (1950). Antigens of frog embryos and of adult frog serum studied by diffusion of antigens into agar columns containing antisera. *J. exp. Zool.* **114**, 403.

EBERT, J. D. (1949). An analysis of the effects of certain anti-organ sera on the development of the early chick blastoderm *in vitro*. *Anat. Rec.* **105**, 12.

— (1950). An analysis of the effect of anti-organ sera on the development *in vitro* of the early chick blastoderm. *J. exp. Zool.* **115**, 351.

— (1951). Ontogenetic change in the antigenic specificity of the chick spleen. *Physiol. Zool.* **24**, 20.

FICKINGER, R. A., & NACE, G. W. (1952). An investigation of proteins during the development of the amphibian embryo. *Exp. Cell Res.* **3**, 393.

GREGG, J. R., & BALLENTINE, R. (1946). Nitrogen metabolism of *Rana pipiens* during embryonic development. *J. exp. Zool.* **103**, 143.

HOFF-JØRGENSEN, E., & ZEUTHEN, E. (1952). Evidence of cytoplasmic deoxyribosides in the frog's egg. *Nature, Lond.* **169**, 245.

LANDSTEINER, E. K. (1945). *The Specificity of Serological Reactions* (revised edit.). Harvard Univ. Press.

LOEB, L. (1945). *The Biological Basis of Individuality*. Springfield, Ill.: Charles Thomas.

MACULLA, E. (1948 a). The immunochemistry of mouse tissue components: I. The comparative antigenic composition of normal mouse tissues. *Yale J. Biol. Med.* **20**, 299.

— (1948 b). A comparison of the antigenic composition of embryonic mouse organs with that of adult mouse organs and with mouse tumours. *Yale J. Biol. Med.* **20**, 465.

NACE, G. W., & SCHECHTMAN, A. M. (1948). Development of non-vitelloid substances in the blood of the chick embryo. *J. exp. Zool.* **108**, 217.

NEEDHAM, J. (1942). *Biochemistry and Morphogenesis*, p. 348 et seq. Cambridge Univ. Press.

OUDIN, J. (1948 a). L'analyse immunochimique qualitative; méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. (1st Part.) *Ann. Inst. Pasteur*, **75**, 30.

— (1948 b). L'analyse immunochimique qualitative; méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. (2nd Part.) *Ann. Inst. Pasteur*, **75**, 109.

PERLMAN, P., & GUSTAFSON, T. (1948). Antigens in the egg and early developmental stages of the sea-urchin. *Experientia*, **4**, 481.

SCHECHTMAN, A. M. (1947). Antigens of early developmental stages of the chick. *J. exp. Zool.* **105**, 3.
— (1948). Organ antigens in the early chick embryo. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **68**, 263.
WEISS, P. (1947). The problem of specificity in growth and development. *Yale J. Biol. Med.* **19**, 235.
WOERDEMAN, M. W. (1950). Over de toepassing von serologische methodes in de experimentale embryologie. *Proc. Acad. Sci. Amst.* **59**, 5.

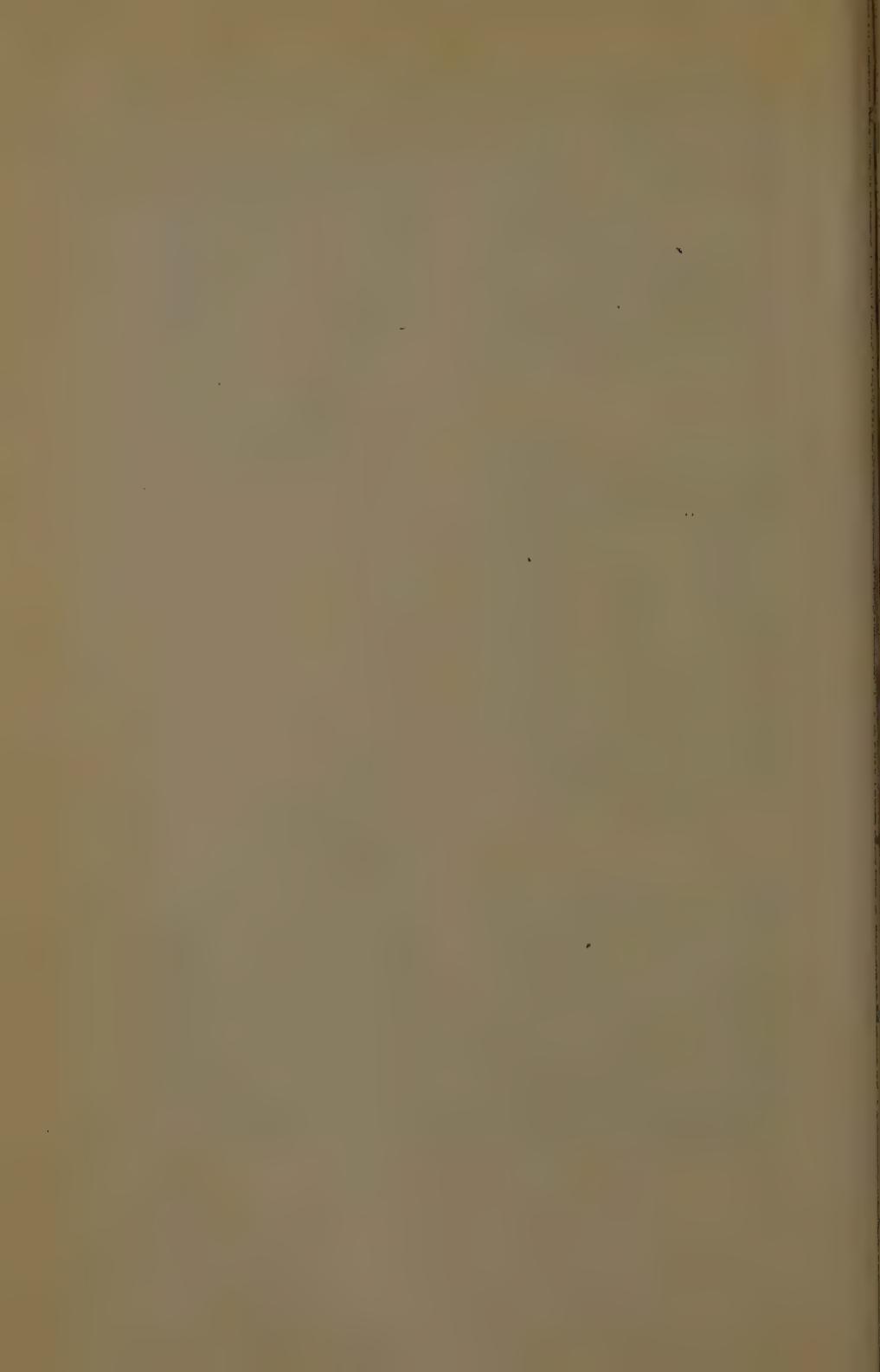
EXPLANATION OF PLATE

- A. Young gastrula in anti-gastrula antiserum. Damage greatest in region of blastopore.
- B. Three gastrulae showing inhibition of blastopore, cultured from late blastula stage in partially absorbed anti-gastrula antiserum; one late blastula killed by unabsorbed anti-gastrula antiserum.
- C. Exaggerated or partially extruded dorsal lip and inhibition of invagination, in embryo cultured from the blastula stage in partially absorbed antiserum.
- D. Cell contents showing some 'precipitation'; nuclei unstained; destruction most advanced in presumptive blastopore region. Embryo cultured in partially absorbed anti-gastrula antiserum.
- E. Reversal of staining properties. Blastula cultured in anti-gastrula serum. Stained haematoxylin and eosin.



R. M. CLAYTON

Plate I



Rate of Regeneration in Planarians after Starvation

by H. V. BRØNDSTED¹

From the Institute of General Zoology, University of Copenhagen

INTRODUCTION

THE question whether starvation influences the rate of regeneration in planarians has been answered variously in the literature. Child (1911), Abeloos (1930), and Wolsky (1935) state that starved animals regenerate at a slower rate than fed ones, while Bardeen (1901) and Sivickis (1933) maintain that they regenerate equally quickly.

The question is important for various reasons, but mainly because the right answer should throw some light on the problem whether the physiological reserves necessary for regeneration are retained completely or at least more tenaciously than other body reserves. If they are not, the retarded regeneration of starved animals might help us to test several substances for their influence on the rate of regeneration.

MATERIAL AND METHOD

In our experiments four species were used to ascertain whether the results of starvation were similar in different species. They were *Dugesia tigrina*, *Planaria vitta*, *Dendrocoelum lacteum*, *Bdellocephala punctata*. The animals were placed in Petri dishes, in most cases 10 in each, with 50 ml. tap-water; the water was renewed every day. The experimental conditions were as much alike as possible in all experiments. Great care was taken that the temperature was the same, $21^\circ \pm 1^\circ$, in the dishes with the starved animals and in those containing the non-starved controls. Regeneration started from a transverse cut just behind the eyes, in the anterior part of the time-graded regeneration field (Brøndsted, 1946). Regeneration of an animal was considered to be finished when both the black eye-spots could be seen at a magnification of $\times 25$ in standard illumination. Only large and therefore presumably well-fed animals were used. This precaution is especially necessary in wild animals, where the nutritional state is not known.

¹ Author's address: Institut for alm. Zoologi, Universitetsparken 3, København Ø, Denmark.

[J. Embryol. exp. Morph. Vol. I, Part 1, pp. 43-47, March 1953]

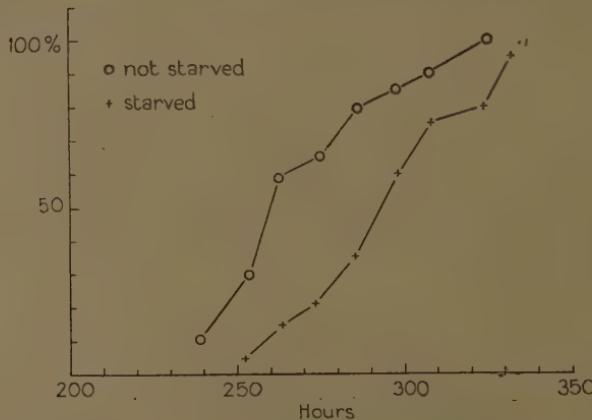
RESULTS

Dugesia tigrina

This species has been kept in our aquarium for years. Normally the animals are fed calf liver twice a week. Two groups of 10 and 11 animals each were starved for 24 days. Two groups of 10 each from the well-fed stock served as controls. By 105 hours after decapitation the 20 controls had regenerated their heads completely. At this time only 15 of the starved animals had regenerated.

Planaria vitta

This species is also reared in our laboratory; it is fed enchytraeids and thrives very well on this diet. Some animals were starved 90 days, and their reduction in size was roughly estimated. Petri dishes with 10 fed and 10 starved animals were placed on a background of paper ruled in millimetres. The lengths of the animals when creeping was measured, and averaged 6.0 mm. for fed animals,



TEXT-FIG. 1. *Planaria vitta*. Percentage of animals with eyes regenerated against time after operation.

2.4 mm. for starved ones, indicating a reduction during starvation to about $\frac{1}{5}$ of the weight of fed animals. Two groups each of 10 such starved animals were used in the experiment, and two groups each of 10 well-fed animals served as controls. *Planaria vitta* is a rather small species. It is therefore difficult to cut individuals at exactly the same level: the cut may be located more posteriorly in the time-graded regeneration field in some animals than in others. This explains why the regeneration curves shown in Text-fig. 1 cover a rather long period of time, because regeneration is slower when a more posterior cut is made.

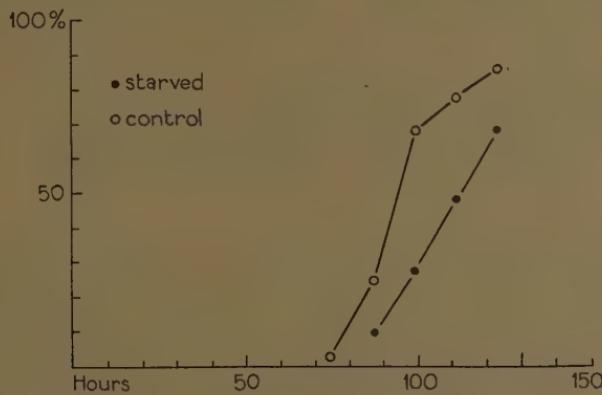
The experiment (Text-fig. 1) shows that the rate of regeneration of the starved animals lags considerably behind that of the controls, an equivalent percentage being reached about 30 hours later.

It should be mentioned that in the course of the regeneration process the controls reproduced asexually to such an extent that 30 buds were produced, whereas the starved animals did not reproduce asexually at all. The experiment is therefore interesting because it suggests that the materials necessary for both regeneration and asexual reproduction are first used for regeneration in starved animals. The problem of the interrelation between the two processes is under investigation in our laboratory.

Dendrocoelum lacteum

These animals were caught under stones on the shore of Lake Furesø near Copenhagen.

In one experiment 20 animals were starved in the laboratory for 14 days after their capture. They all regenerated completely after 117 hours, whereas the con-



TEXT-FIG. 2. *Dendrocoelum lacteum*. Percentage of animals with eyes regenerated against time after operation.

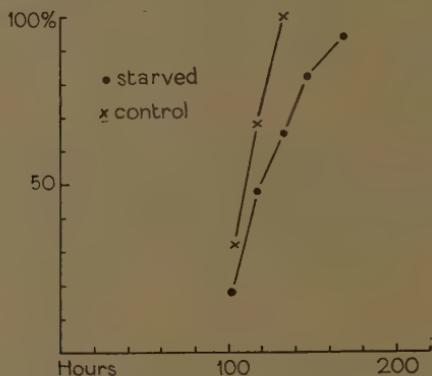
trols (also 20 animals but freshly captured) required 105 hours for all of them to regenerate.

In another experiment 40 animals were starved for 16 days in the laboratory before operation, and 40 animals operated on 2 days after their capture served as controls. Due to various circumstances completion of regeneration for all the animals was not observed. Nevertheless the result was clear, as shown in Text-fig. 2. As in the previous experiment, the starved animals lagged behind in regeneration by 10–20 hours.

Bdellocephala punctata

This species was collected under stones on the shore of Lake Furesø together with *Dendrocoelum lacteum*. Twenty specimens were starved for 34 days in the laboratory (at about 20° C.) before operation. Three of these specimens died 1 day after operation. Twenty animals which had been kept without food for

14 days, at temperatures varying from 4° to 8° C., served as controls. Such starvation is very slight because of the decreased metabolism at such low temperatures. One specimen died 2 days after operation. Text-fig. 3 shows the result. The starved animals lagged behind the controls by 5 to 35 hours.



TEXT-FIG. 3. *Bdellocephala punctata*. Percentage of animals with eyes regenerated against time after operation.

DISCUSSION

These experiments with four species strongly suggest that starvation retards regeneration.

The retardation is somewhat different in the four species. It seems to be more pronounced in *Dendrocoelum* than in *Bdellocephala*, although the two species are systematically more closely related to one another than to either of the two other species; this is also revealed by the fact that the time-graded field of head regeneration in the two species is nearly identical (Brøndsted, 1946). None the less *Dendrocoelum* is more sensitive to starvation than *Bdellocephala*, as shown by a faster diminution of body size (judged by eye; no measurements have been made). This is presumably due to the fact that the latter species is more sluggish than most planarians, whereas the former is rather lively.

It is difficult to evaluate the retardation of regeneration after starvation in *Planaria vitta* as compared to the other species, because its regeneration rate is so slow. The rather great difference between the time of regeneration of the starved and not starved animals may be due to the long regeneration time in general in this species.

The fact that the rate of regeneration is decreased by starvation is presumably due to some physiological deficiency resulting from starvation. This may appear surprising because planarians are known for their extraordinary ability to starve and nevertheless to retain their morphological integrity; this itself may well be called a sort of regeneration. It is reasonable to assume that an ordinary regenera-

tion after damage of a normally fed animal has the chemical resources necessary for such a process, so to say, ready at hand. Obviously the resources are also present in the body of the starved animal, as is indicated by the fact that it *does* regenerate; but the retardation in regeneration rate might be explained on the assumption that some substances have been used up, or nearly so, during starvation, substances which require some time to be rebuilt. This gives us a possibility of investigating the problem as to what substances must be available in the animal if it is to regenerate at a normal rate. Experiments are in progress in this laboratory; a start has been made with ribo-nucleic acid (Brøndsted, A. & H. V., 1953).

SUMMARY

Experiments with four planarian species, *Dugesia tigrina*, *Planaria vitta*, *Dendrocoelum lacteum*, and *Bdellocephala punctata*, indicate that starvation retards the rate of regeneration.

My thanks are due to the Carlsberg Foundation, Nordisk Insulin Foundation, and the Kongstad Foundation for financial support, and to Mrs. A. Brøndsted for carrying out several of the experiments.

REFERENCES

ABELOOS, M. (1930). Recherches expérimentales sur la croissance et la régénération chez les Planaires. *Bull. biol.* **64**, 1–140.

BARDEEN, C. R. (1901). On the physiology of the Planaria maculata with special reference to the phenomena of regeneration. *Amer. J. Physiol.* **5**, 1–55.

BRØNDSTED, H. V. (1946). The existence of a static, potential and graded regeneration field in Planarians. *Biol. Medd., Kbh.* **20**, No. 4.

BRØNDSTED, A. & H. V. (1953). The acceleration of regeneration in starved planarians by ribo-nucleic acid. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 49–54.

CHILD, C. M. (1911). Experimental control of morphogenesis in the regulation of Planaria. *Biol. Bull.* **20**, 309–31.

SIVICKIS, P. B. (1933). Studies on the physiology of regeneration in triclad. *Vytauto didziojo universiteto mat. Gamtos fakulteto darbai*, **1**, 369–441.

WOLSKY, ALEX A. (1935). Starvation and regenerative potency in *Dendrocoelum lacteum*. *Nature, Lond.* **135**, 102.

The Acceleration of Regeneration in Starved Planarians by Ribonucleic Acid

by AGNES and H. V. BRØNDSTED¹

From the Institute of General Zoology, University of Copenhagen

INTRODUCTION

IT appears to be highly probable (Brøndsted, 1953) that starvation retards regeneration in planarians.

This finding justifies closer investigation into the importance of various substances for regeneration. Regeneration is of course a very complicated phenomenon and involves chains and networks of innumerable chemical processes. Amongst the substances involved it seems profitable to focus on those which are known to be or assumed to be of immediate importance for morphogenetic processes.

In this work the influence of ribonucleic acid (RNA) has been investigated, starting from the suggestion of J. Brachet (1947) and others that ribonucleic acid may have a direct effect on morphogenesis.

MATERIAL AND METHOD

Three planarian species were used: *Dendrocoelum lacteum*, *Planaria vitta*, and *Euplanaria lugubris*. Samples of ribonucleic acid Roche were put at our disposal by Dr. H. Kalckar; we owe him our sincere thanks for this, and also for technical suggestions. The animals were kept in Petri dishes containing 50 ml. fluid; 10 animals were placed in each dish. Great care was taken that experimental animals and controls regenerated at exactly the same temperature, $21^\circ \pm 1^\circ$ C. It is known that bacteria actively consume ribonucleic acid in solution; the fluid in the dishes was therefore renewed every day. In most experiments the animals were cut transversely just behind the eyes, that is at the highest level of the time-graded head regeneration field (Brøndsted, 1946).

500 mg. of nucleic acid were added to 1,000 ml. tap-water, the bottle was shaken for several hours and the solution filtered. The residue was dried and weighed; it amounted to about 100 mg. The stock solution therefore contained about 0.04 per cent. ribonucleic acid. This solution was stored in the icebox at 2° C. for no longer than a week. After that time a new solution was prepared.

¹ Authors' address: Institut for alm. Zoologi, Universitetsparken 3, København Ø, Denmark.

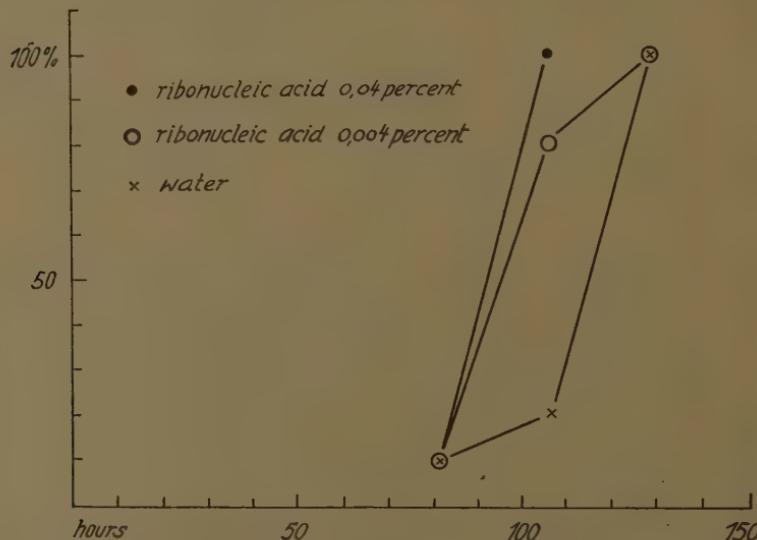
Regeneration of an animal was considered complete as soon as two dark eye-spots could be seen at a magnification of $\times 25$ in standard illumination.

RESULTS

Dendrocoelum lacteum

Several experiments were made to find out at which concentration positive results, if any, could be obtained. Some of these experiments are described here.

1. Forty animals were kept in 0.04 per cent. non-buffered RNA at pH 6; 40 controls in tap-water of pH 7.2. The animals were cut half-way between the eyes and the pharynx. It soon became clear that the saturated RNA did not suit the animals; altogether 22 animals (55 per cent.) died at various times during the experiment. Sixteen (43 per cent.) of the 37 still living animals had regenerated after 184 hours against 24 (67 per cent.) of the 36 living controls. After 232 hours, 14 (78 per cent.) of the remaining 18 living animals in RNA had completed regeneration against 32 (89 per cent.) of the 36 remaining controls. The long regeneration time required in this experiment is due to the fact that the cut was

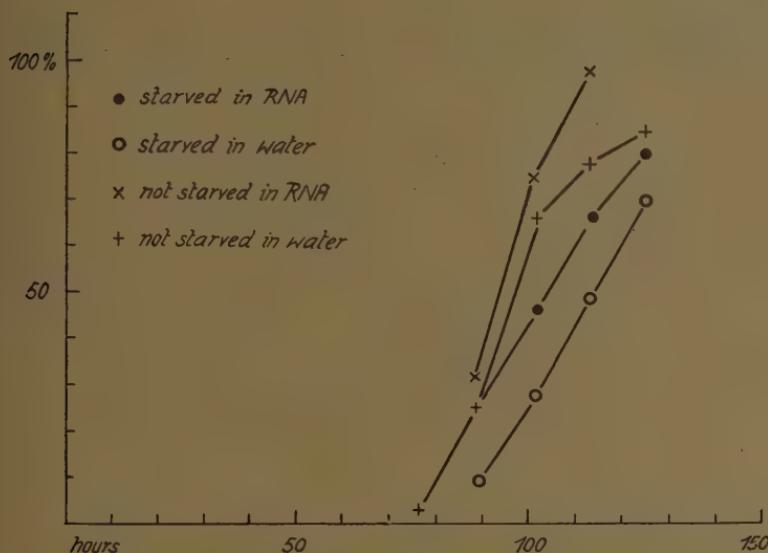


TEXT-FIG. 1. Accelerating influence of RNA on the regeneration of *Dendrocoelum lacteum*.

made at a relatively posterior level in the time-graded regeneration field, where head formation requires more time than when the cut is made just behind the eyes.

2. Twenty animals were placed in 0.04 per cent. RNA, non-buffered, pH 6,

10 animals in 0.004 per cent. RNA, non-buffered, pH 6.5, and 9 animals in tap-water. The animals remained in RNA for only 24 hours after cutting; they were then put into tap-water in order to avoid the deleterious effect of the acid solution. Text-fig. 1 gives the result, showing an accelerating influence of RNA on regeneration. These animals had been captured under stones on the shore of Lake Furesø near Copenhagen, and had lived only a few days in the laboratory



TEXT-FIG. 2. Accelerating influence of RNA on the regeneration of *Dendrocoelum lacteum*.

prior to the operation. All seemed to be healthy, but nothing can of course be said about their state of feeding.

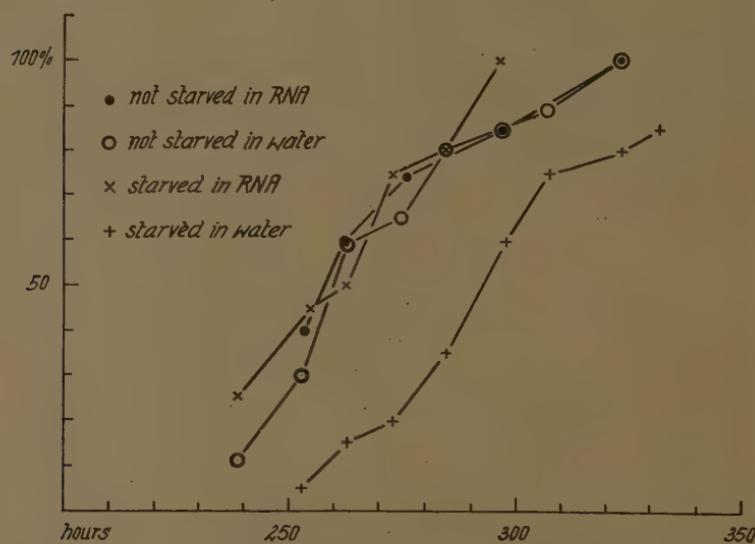
3. Forty animals, starved for 16 days in the laboratory, were put in a 0.004 per cent. RNA solution; 40 other animals, also starved for 16 days, served as controls. A further 40 animals, kept in the laboratory before operation only 2 days after their capture, were also put in a 0.004 per cent. RNA solution, with 40 freshly captured animals as controls in tap-water. Text-fig. 2 illustrates the results. The curves suggest that the starved animals lag behind the non-starved ones with respect to regeneration time, and that in both starved and non-starved animals RNA speeds up regeneration.

Planaria vitta

This species has been kept for years in our aquarium at room temperature. The animals are fed enchytraeids twice a week and thrive very well on this diet,

multiplying actively by fission. They are rather delicate animals; it was therefore considered advisable to adjust the pH of the RNA solution to 7.1 with NaOH.

Twenty well-fed animals were placed in 0.008 per cent. RNA; 20 animals in tap-water served as controls. Twenty animals starved for 90 days were simultaneously placed in a 0.008 per cent. RNA solution; another 20 starved animals served as controls in tap-water. Text-fig. 3 shows the results of the experiments. Whereas RNA does not accelerate regeneration in animals of optimal nutritional condition, it accelerates regeneration of starved animals. It may be mentioned that the starved animals behaved much more actively in RNA than did



TEXT-FIG. 3. Accelerating influence of RNA on the regeneration of *Planaria vitta*.

the controls in tap-water. Another observation worth mentioning is the following: whereas the well-fed animals produced 30 new individuals by fission in tap-water, the 20 animals in RNA produced only 13 during the experiment.

Euplanaria lugubris

The animals had been captured in a pond near Copenhagen and starved in the laboratory for 14 days. Forty animals were decapitated, 20 of them placed in buffered (pH 7.1) 0.008 per cent. RNA, 20 in tap-water as controls.

After 104 hours 18 out of the 19 living animals in RNA had regenerated; in tap-water 15 animals out of 20. Immediately after completion of regeneration the animals were again decapitated (the heads being fixed in Bouin's fluid) and the RNA animals placed in buffered 0.008 per cent. RNA, the controls in tap-

water. Again RNA proved to have an accelerating influence on regeneration, even more so than in the first experiment. After 88 hours all the surviving 18 animals in RNA had completed regeneration, whereas only 7 out of 15 living controls had done so at the same time.

Fifty hours later the animals were decapitated for the third time. The RNA animals were again placed in RNA, the controls in tap-water. After 80 hours 13 of 16 living RNA animals had regenerated, but only 3 of 15 living controls. After 97 hours 14 of the RNA animals and 11 of the controls had regenerated.

All the animals were now placed in tap-water for 100 hours, then decapitated again, and the former RNA animals were placed in tap-water, the controls in RNA, with the puzzling result that all the former RNA animals, now in water, had regenerated after 115 hours, whereas only 4 out of 10 living former controls in tap-water, now in RNA, had by then regenerated. This indicates that the prolonged stay in RNA has given the former RNA animals a store of this substance to draw upon, so that when placed in tap-water they still exceed the animals which had only had limited possibilities of taking up RNA.

A question of considerable interest is this: in RNA, are the organs regenerated merely faster, or are they also regenerated in larger amount?

In order to get some preliminary information about this problem, the decapitated heads from the first stage of regeneration were fixed in Bouin's fluid and the following dimensions measured: breadth of the head transversely at the eye level; distance between the eyes; diameter of the pigmented eyespots. The first two dimensions were measured in order to register the size of the animal, the third to obtain an impression of the quantity of regeneration. The following figures were found: breadth of the heads of the RNA animals 89 per cent. of that of the controls. Distance between the eyes of the RNA animals 94 per cent. of that of the controls. Diameter of eyespots in the RNA animals 107 per cent. These findings perhaps suggest that more neoblasts (totipotent regeneration cells) are activated in RNA animals than in the controls.

DISCUSSION

These experiments seem to show that RNA accelerates regeneration, at least in starved animals. That RNA accelerates regeneration in three distinct and rather separate species indicates that the processes involved must be basic ones. The problem arises whether perhaps RNA in our experiments serves only as a food. We have no way of answering the question, but all considerations seem to point towards an action by RNA in low concentrations as a stimulating substance or 'Wirkstoff' rather than as a food.

We have tried, so far without result, to detect with staining techniques (pyronin, gallocyanin) if the cells of the RNA animals show a high content of RNA.

SUMMARY

Experiments indicate that RNA in concentrations of the order of 1:10,000 accelerates the rate of regeneration in starved planarians.

Our thanks are due to the Carlsberg Foundation, Nordisk Insulin Foundation, and Kongstad Foundation for financial help.

REFERENCES

BRACHET, J. (1947). *Embryologie chimique* (2e éd.). Paris: Masson.
BRØNDSTED, H. V. (1946). The existence of a static, potential and graded regeneration field in planarians. *Biol. Medd., Kbh.* **20**, No. 4.
— (1953). Rate of regeneration in planarians after starvation. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 43-47.

Essais de cultures *in vitro* d'organes embryonnaires en milieux synthétiques

par ETIENNE WOLFF, KATY HAFFEN, MADELEINE KIENY
et EMILIENNE WOLFF¹

Laboratoire d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences de Strasbourg et du Centre
National de la Recherche Scientifique Française

AVEC DEUX PLANCHES

INTRODUCTION	56	Aspect morphologique	68
MATÉRIEL ET MÉTHODES	57	Conclusion	69
<i>Milieux de Culture</i>	58	C. Problème de la croissance des syrinx de poulet en culture <i>in vitro</i>	69
(a) Milieu B	59	Conclusion	69
(b) " C	59	III. <i>Explantation des tibias</i>	70
(c) " vitaminé	59	A. Culture sur milieux naturels	70
<i>Mesures de la croissance</i>	59	B. Explantation sur milieu physiologique dépourvu d'aliments azotés	71
<i>Différenciation</i>	60	C. Explantation sur milieux synthétiques à base d'acides aminés	73
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	60	D. Développement histologique	74
I. <i>Culture des gonades</i>	60	(a) Aspect histologique de l'ex- plant au moment de la mise en culture	74
A. Evolution des explants prélevés avant la différenciation sexuelle et cultivés sur le milieu B/2	61	(b) Evolution de l'explant sur milieux synthétiques et naturels	75
1. Aspect morphologique	61	(c) Evolution de l'explant sur milieu T+P	75
2. Histologie des explants	61	Conclusion	75
B. Evolution des explants sur milieu C/2	61	DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	76
1. Différenciation testiculaire	62	<i>Les problèmes de la différenciation</i>	76
2. Différenciation ovarienne	62	(a) Gonades	76
C. Problème de la croissance des gonades embryonnaires de poulet en culture <i>in vitro</i>	62	(b) Syrinx	77
Conclusion	62	(c) Tibias	77
II. <i>Culture de syrinx</i>	64	<i>Les problèmes de la croissance</i>	78
A. Evolution des explants prélevés avant la différenciation des carti- lages	66	(a) Les besoins spéciaux des organes explantés	78
1. Aspect morphologique	66	(b) Croissance et différenciation	79
(a) Milieu naturel	66	(c) Croissance pondérale et bilan azoté	79
(b) Milieux synthétiques	66	RÉSUMÉ	80
2. Aspect histologique	67	TRAVAUX CITÉS	82
Conclusion	67	EXPLICATION DES PLANCHES	83

¹ Authors' address: Laboratoire d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences, 12 rue de l'Université, Strasbourg.

INTRODUCTION

POUR la commodité de l'exposé, nous distinguerons deux modalités de cultures *in vitro*: les cultures en *milieux naturels*, qui utilisent les aliments extraits des organismes vivants, tels que le jus d'embryon, le plasma, le serum; les cultures en *milieux synthétiques*, qui substituent à ces liquides complexes des mélanges de substances chimiquement définies, telles que sucres, acides aminés.

La technique en milieu naturel, publiée par Et. Wolff & K. Haffen (1951, 1952 *a, b*), s'est révélée d'un emploi très général pour la culture d'organes embryonnaires à certains stades du développement des Vertébrés Amniotes. Nous avons obtenu jusqu'à ce jour, au cours de recherches déjà publiées ou encore inédites, la culture des glandes génitales des Oiseaux (Et. Wolff & K. Haffen, 1952c), des glandes génitales et des conduits génito-urinaires de la Souris (Et. Wolff, 1952), de la syrinx et du tubercule génital du Canard (Et. Wolff, Em. Wolff & K. Haffen, 1951; Et. Wolff & Em. Wolff, 1952 *a, b*), des canaux de Müller et de Wolff du poulet (Et. Wolff & Y. Lutz-Ostertag, 1952), des os longs (tibias) (M. Kieny), de la peau (N. Lepori), du système nerveux (Ph. Sengel), du mésonephros, des yeux, etc. Le succès de ces cultures n'implique pas seulement la survie des organes explantés, mais leur différenciation et leur croissance.

Dans plusieurs cas, la différenciation sexuelle des organes sexués a pu être modifiée expérimentalement par l'action d'hormones, de facteurs alimentaires, de substances inhibitrices (recherches d'Et. Wolff & K. Haffen, 1952d; Et. Wolff & Em. Wolff, 1952b; Et. Wolff, K. Haffen & Em. Wolff, 1953; recherches encore inédites de B. Salzgeber sur les inhibiteurs).

Rappelons que le milieu dont nous préconisons l'emploi est constitué d'un substratum de gélose préparée dans un liquide physiologique, de la solution de Tyrode et d'extract d'embryons de poulet. La solution de Tyrode fournit le glucose; l'extract d'embryon fournit les substances protidiques, éventuellement les vitamines et les facteurs adjuvants de la croissance. La différence principale entre ce milieu et les milieux de culture employés avant nous pour la culture des tissus et des organes, consiste en ce que l'extract embryonnaire est le seul aliment extract d'un organisme; il ne comporte généralement pas de plasma et le substratum a des propriétés très constantes. Ce milieu est moins nutritif que celui qu'ont employé avec succès Fell (1928) et tous les auteurs qui ont suivi son exemple. Des milieux riches en substances nutritives favorisent la culture incoordonnée des cellules migratrices et nuisent à l'intégrité et au développement des ensembles structuraux. C'est pourquoi notre milieu 'Standard' s'est révélé favorable à l'explantation des organes embryonnaires en général, et en particulier à la culture de certains organes très délicats. Il est très aisément d'adapter aux besoins individuels des organes, en modifiant l'apport des substances nutritives, soit qualitativement, soit quantitativement.

Le but des recherches dont nous apportons ici les premiers résultats est de substituer à l'extract embryonnaire des substances azotées de constitution chimique

définie, en l'espèce des mélanges d'acides aminés. Ainsi l'on remplacerait un milieu *naturel* par un milieu *synthétique*. Nous avons d'abord remarqué que le substratum de base permet une survie notable des organes qui sont explantés sur lui — à condition que l'on maintienne la teneur en glucose du milieu (cf. Spratt, 1949). Il s'agissait donc d'améliorer les conditions de survie que l'on obtient sur ce milieu et de stimuler en outre la croissance et la différenciation.

Nous avons tenté l'expérience sur trois catégories d'organes: les gonades, les tibias, les syrinx d'embryons de poulet, ainsi que nous l'avons annoncé dans une communication préliminaire (Et. Wolff, K. Haffen, M. Kiény & Em. Wolff, 1953). Nombreux sont les auteurs (Fischer *et al.*, 1948; White, 1946; Morgan, Morton & Parker, 1950; Waymouth¹) qui ont essayé de cultiver des tissus en milieux synthétiques. Il s'agissait dans tous les cas de cultures *histiotypiques*. Il semble qu'en général ils n'ont pas obtenu autre chose que la survie et la migration des cellules explantées, du moins sur des milieux de composition chimique parfaitement définie. Le résultat essentiel de nos recherches est que, *dans le cas de cultures organotypiques, nous avons obtenu, outre la survie, la croissance et la différenciation des organes explantés*. La voie ainsi ouverte donne la possibilité d'explorer les besoins nutritifs des différents organes embryonnaires.

Il convient toutefois d'ajouter que le but de la culture des tissus n'est pas exactement le même que celui des cultures d'organes. Les uns tendent à obtenir une prolifération sinon indéfinie, du moins de longue durée, les autres se contentent d'une évolution limitée, permettant à l'organe de franchir une ou plusieurs étapes du développement. Mais il ne s'agit pas d'obtenir — dans l'état actuel des recherches — une croissance illimitée des explants, que nous n'avons pas réalisée même en milieux *naturels*. Il ne faut pas oublier d'autre part que l'organe explanté apporte avec lui — et conserve sans doute quelque temps — des substances qui peuvent aider à l'assimilation des substances azotées des milieux synthétiques, tandis que les cellules des cultures histiotypiques, après un ou plusieurs repiquages, n'ont peut-être plus cette ressource.

Remarquons, que dans l'état actuel de nos recherches, la survie et le développement des organes explantés n'excèdent pas quelques jours et que nous n'avons pas encore réussi à transgresser ces limites. Ainsi le problème de la nutrition indéfinie d'organes livrés à leurs seules ressources et à celles du milieu n'est ni abordé ni résolu. Nos recherches s'inscrivent dans le cadre de l'embryologie expérimentale et cherchent à analyser les facteurs nutritifs de la différenciation et de la croissance pendant une phase déterminée du développement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les organes soumis à l'expérience ont été prélevés sur des embryons de poulet de 6 à 10 jours d'incubation. Les gonades et la syrinx représentent des ensembles

¹ D'après les données qui nous ont été obligamment communiquées par Miss Waymouth, les milieux qui ne contiennent que des acides aminés comme aliments azotés sont incapables d'assurer la croissance. Celle-ci n'apparaît que lorsqu'on ajoute des peptides plus complexes (peptone de Witt).

complexes dont il est intéressant de suivre la destinée *in vitro*: comment se comportent leurs constituants, quels sont leurs besoins particuliers? Les gonades prélevées avant la différenciation sexuelle se différencient-elles en milieu synthétique, quel est le sort des éléments somatiques et germinaux? En ce qui concerne la syrinx du poulet, les différents éléments structuraux continuent-ils leur développement, les cartilages se différencient-ils, s'ils ne sont pas ébauchés? Nous nous sommes adressés d'autre part au tibia de l'embryon de poulet — pour éprouver si les maquettes cartilagineuses isolées continuent leur croissance et leur différenciation dans de tels milieux.

Des témoins ont été prélevés au début de l'expérience — pour comparer les organes au départ et à l'arrivée. Dans le cas des gonades (testicules) et des tibias, c'est le partenaire, droit ou gauche, de l'organe explanté qui a servi de témoin. En ce qui concerne les syrinx, des témoins de même âge et de la même couvée que les sujets ont été prélevés en grand nombre au moment des expériences — afin que l'on pût mesurer la croissance quantitative moyenne des explants.

D'autre part, des témoins ont été cultivés sur des milieux naturels (milieu dit 'Standard'), pour permettre de comparer la croissance des explants sur de tels milieux à celle qu'on obtient sur des milieux synthétiques.

Milieux de culture

Rappelons d'abord la constitution du *milieu Standard*, que nous avons donnée dans d'autres travaux (Et. Wolff & K. Haffen, 1952b):

Gélose à 1% préparée dans le liquide de Gey	6 parties
Liquide de Tyrode	3 "
Extrait d'embryon de poulet dilué de 50%	
dans le liquide de Tyrode	3 "
Pénicilline retard (éventuellement)	1 goutte

Nous appelons *milieu T* un milieu constitué par le substratum de base additionné de glucose — sans adjonction d'aliments quaternaires. Il est ainsi constitué:

Gélose à 1% préparée dans le liquide de Gey	6 parties
Solution de Tyrode	6 "

Les milieux synthétiques sont préparés de la manière suivante:

Gélose à 1% préparée dans le liquide de Gey	9 parties
Sol. d'acides aminés préparée dans le liquide de Tyrode	6 "

La préparation de ces milieux est faite suivant la technique que nous avons décrite à propos des milieux Standard naturels. Nous avons employé différents mélanges d'acides aminés — auxquels nous adjoignons dans certains cas des mélanges de vitamines.

(a) *Milieu B*. Nous nous sommes adressés d'abord au mélange d'acides aminés de Bergmann et Niemann, avec lequel Fischer (1941) a tenté la culture de cellules en milieu synthétique. Ce mélange répond à la constitution suivante:

Solution B

L(+) lysine 2 HCl	15.1 mg.	acide DL-aspartique	5.9
L(+) arginine base	7.7	L(-) proline	5.1
DL-méthionine	2.6	L(-) cystéine HCl	1.5
DL-histidine HCl	3.1	L(-) tryptophane	5
acide L(+) glutamique	14.1		

Le tout est dissous dans 25 c.c. de liquide de Tyrode.

Nous appelons milieu B le milieu dans lequel cette solution est ajoutée telle quelle à la gélose, dans les proportions indiquées plus haut. Dans certains cas, la solution B est additionnée d'un volume égal ou de 9 fois son volume de Tyrode. Nous appelons les milieux correspondants milieux B/2 et B/10.

(b) *Milieu C*. Nous avons employé dans d'autres expériences des solutions contenant un plus grand nombre d'acides aminés, choisis parmi les constituants considérés comme essentiels pour la croissance des organismes et des cultures.

Nous appelons solution C le mélange suivant:

L(+) lysine 2 HCl	15.1 mg.	DL-isoleucine	10
L(+) arginine base	7.7	DL-thréonine	12
DL-méthionine	2.6	DL-valine	14
DL-histidine HCl	3.1	glycine	2.5
acide L(+) glutamique	14.1	L(−) tyrosine	1
acide DL-aspartique	5.9	L(−) hydroxyproline	2.5
L(−) proline	5.1	DL-sérine	12.5
L(−) cystéine HCl	1.5	taurine	5
L(−) tryptophane	5	ornithine 2 HCl	5
DL-phénylalanine	7	L(−) asparagine	5
L(−) leucine	9		

Tous ces acides aminés sont dissous dans 25 c.c. de liquide de Tyrode et stérilisés à l'autoclave. Le pH est de 7.5.

Milieu C¹. A la solution C, on ajoute 0.25 mg. de glutathion. Nous appelons milieux C, C¹ les milieux dans lesquels les solutions précédentes sont mélangées telles quelles à la gélose. Dans les milieux C/2, C¹/2, les solutions sont additionnées de 1 fois leur volume de liquide de Tyrode. Dans les milieux C/10, C¹/10, elles sont additionnées de 9 fois leur volume de Tyrode.

(c) *Milieux vitaminés*. Dans certains cas, nous avons ajouté aux milieux B ou C des solutions de vitamines. Nous avons employé la solution suivante:

Solution V 1

aneurine	0.5 mg.	biotine	0.01
riboflavine	0.05	acide L(+) ascorbique	0.3
acide folique	0.01	pour 100 c.c. de liquide de Tyrode	

Les milieux vitaminés ont la composition suivante:

gélose	9 parties
solution d'acides aminés	5 "
" vitaminée	1 "

Le milieu C/2 + V 1 correspond par exemple à la solution C/2 additionnée de la solution V 1 dans les proportions ainsi définies. Les organes ont été prélevés sur des embryons de 6 à 10 jours d'incubation, dont l'âge sera précisé dans chaque cas particulier. Ils sont soigneusement lavés dans le liquide de Tyrode, puis ils sont déposés sur le milieu de culture, dans les conditions que nous avons décrites dans des travaux antérieurs (Et. Wolff & K. Haffen, 1952b). Des lavages et repiquages sont faits éventuellement tous les 2 ou 3 jours.

Mesures de la croissance

Des organes comme les tibias ont donné lieu à des mensurations directes: mesures de la croissance en longueur au début, en cours et à la fin de l'expérience, pesées du même organe avant et après l'explantation.

Les gonades et les syrinx, organes beaucoup plus délicats, n'ont pu être soumis à des pesées. Nous nous sommes adressés à une méthode indirecte, le dosage de l'Azote total des explants qui offre l'avantage de nous renseigner sur l'assimilation réelle des acides aminés. Nous utilisons une ultra-microméthode, dérivée de la technique de Kjeldahl, qui a été décrite et employée par R. Vendrely (1947). La distillation est effectuée dans l'appareil de Markham, la titration au moyen d'une microburette de Linderström-Lang de capacité 100λ , graduée en $1/5$ de λ . Au point de vue qualitatif, la prolifération est attestée par les mitoses que l'on observe sur les préparations histologiques d'un grand nombre d'explants.

Différenciation

La marche de la différenciation a été appréciée d'après la morphogenèse générale des explants et de leurs parties (formation du cortex ovarien, individualisation des cartilages de la syrinx, modelé des épiphyses et des facettes articulaires des tibias) et par l'examen histologique des explants comparés aux organes fixés au moment du prélèvement. Des coupes séries à 5μ ont été faites après fixation au liquide de Bouin. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline ferrique ou au glychémalun de Mayer-éosine, ou au trichromique de Masson (dans le cas des explants de tibias).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Culture des gonades (K. Haffen)

Au cours de recherches antérieures, nous avons montré que l'on peut obtenir la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau suivant la technique que nous avons mise au point.

Si les gonades de l'embryon de canard, prélevées avant ou après la différenciation sexuelle, se différencient en ovaires et en testicules, selon leur sexe génétique, les gonades de l'embryon de poulet nous ont donné des résultats différents.¹ Les ovaires gauches d'embryons de poulet, cultivés sur le milieu Standard habituel, évoluent *en ovotestis*. Les gonades droites ♀ se différencient en testicules. Les gonades ♂ explantées subissent la différenciation testiculaire typique. L'interprétation de ces résultats a été discutée au cours d'un travail antérieur (Et. Wolff & K. Haffen, 1952e).

Comment évoluent les gonades embryonnaires de poulet lorsqu'on leur donne, au lieu de l'extrait embryonnaire, des principes nutritifs plus simples, de constitution connue?

Lorsque l'on explante des gonades d'embryons de poulet, prélevées avant ou après le stade de la différenciation sexuelle, sur un milieu dépourvu de toute substance nutritive tertiaire ou quaternaire, c.à.d. sur un milieu réduit au substratum de base, elles ne tardent pas à se nécroser. Si l'on ajoute au milieu du glucose (milieu T), dans les proportions habituellement utilisées dans le liquide

¹ Les recherches relatées ici ont été effectuées sur l'embryon de poulet à une époque de l'année où l'on ne peut se procurer un nombre suffisant d'œufs de cane. Si les résultats de la différenciation sexuelle sont plus simples et plus nets chez l'embryon de canard, l'embryon de poulet peut aussi bien être utilisé pour les recherches sur la nutrition, la croissance et la différenciation en milieux synthétiques.

physiologique de Tyrode, on obtient une survie de plusieurs jours, s'il s'agit de gonades prélevées à un stade assez avancé de la différenciation sexuelle. On ne constate toutefois aucune croissance de ces gonades.

A. Evolution des explants prélevés avant la différenciation sexuelle et cultivés sur Milieu B/2

1. *Aspect morphologique.* Les gonades embryonnaires de poulet, prélevées avant la différenciation sexuelle, entre le 8^e et le 9^e jour de l'incubation, et cultivées sur milieu B/2, évoluent d'une manière presque identique dans les deux sexes. Les caractères morphologiques qui distinguent la différenciation ♂ de la différenciation ♀ ne sont que très peu apparents. Les gonades gauches et droites génétiquement ♂ acquièrent peu à peu la forme de petits boyaux renflés, cylindriques, légèrement translucides. Les gonades gauches, génétiquement ♀, évoluent en s'aplatissant plus ou moins sur le milieu de culture, mais ne s'entourent que très rarement d'une frange transparente, signe extérieur de la différenciation ovarienne. La région centrale est plus massive.

Les gonades droites génétiquement ♀ n'ont pas de caractères extérieurs qui les distinguent nettement des testicules. Elles sont légèrement plus aplatis. Elles ne manifestent aucun signe de régression.

2. *Histologie des explants.* Histologiquement les testicules ne présentent pas dans tous les cas un aspect testiculaire très typique. Ils sont constitués de cordons dont les cellules pariétales, assez régulièrement organisées, forment un épithélium sertolien. Le centre n'est pas toujours très vacuolisé. Le fait que les lumières sont en général plus étroites que celles des testicules cultivés sur le milieu Standard, leur confère un aspect moins bien différencié. Il persiste très souvent dans le cas des testicules gauches des lambeaux d'épithélium germinatif plus ou moins épais. Ces gonades sont généralement fertiles. On y rencontre d'assez nombreuses mitoses.

L'histologie des ovaires montre la même différenciation aberrante que celle qu'on observe dans le cas des gonades cultivées sur milieu Standard. Ces gonades présentent l'aspect d'ovotestis. Si elles ont été prélevées à un stade jeune, le cortex est très souvent mince. On y trouve des ovogonies. La médullaire, qui occupe la plus grande partie de l'organe, contient des tubes d'aspect presque toujours testiculaire.

Les gonades droites ♀ ont histologiquement l'allure testiculaire, quoique les cordons soient assez souvent mal différenciés.

B. Evolution des explants cultivés sur milieu C/2

Ce milieu, qui comprend 21 acides aminés incorporés au substratum de base, s'est révélé encore plus favorable à la culture des gonades embryonnaires que le milieu B/2. Au point de vue de la différenciation morphologique et histologique, les résultats sont très proches de ceux que nous avons obtenus sur le milieu à base d'extrait embryonnaire.

Des gonades, prélevées avant le stade de la différenciation sexuelle, entre le

8^{ème} et le 9^{ème} jour de l'incubation, se différencient en ovaires et en testicules, reconnaissables à leur aspect extérieur (Pl. 1, A et B).

1. *Différenciation testiculaire.* Après 5 jours d'explantation, on reconnaît aisément les testicules à leur forme. Ce sont des boyaux renflés, cylindriques, quelquefois fuselés. Ils sont beaucoup plus translucides que sur le milieu B/2 (Pl. 1, B).

Histologiquement ils acquièrent la structure ♂ (Pl. 1, C). Ils sont entourés d'une enveloppe conjonctive. A l'intérieur, les cordons testiculaires s'élargissent. Les cellules de Sertoli s'alignent régulièrement le long des parois des cordons. Les cellules germinales sont très nombreuses et sont inégalement réparties dans les cordons. A la surface de certains testicules gauches, il subsiste encore des fragments d'épithélium germinatif. Les tubes testiculaires sont souvent en rapport avec ces lambeaux ou s'ouvrent directement à l'extérieur.

On rencontre de très nombreuses mitoses parmi les cellules de Sertoli, les gonocytes et le tissu intertubulaire.

2. *Différenciation ovarienne.* Les gonades gauches ♀ prennent l'aspect d'ovaires reconnaissables de l'extérieur. Un ou 2 jours après leur mise en culture, ces gonades s'aplatissent, le centre massif et opaque est entouré d'une mince frange transparente, qui s'accentue dans un grand nombre de cas (Pl. 1, A).

Histologiquement ces ovaires ont l'aspect typique des ovotestis obtenus sur le milieu Standard (Pl. 1, E et F). Le cortex, par endroits très épais, contient de nombreuses ovogonies au repos. Dans certains cas, le cortex est stérile (Pl. 1, D), comme nous l'avons aussi observé sur milieu Standard. La médullaire constitue un important massif de tubes d'aspect testiculaire, souvent très bien différenciés. Les mitoses sont également très abondantes dans les tissus somatiques des deux zones. On en trouve aussi dans quelques ovogonies.

Les gonades droites ♀ ne sont pas reconnaissables en tant que femelles à leur aspect extérieur. Elles ont la forme de petits testicules aplatis (Pl. 1, A à droite). Elles ne régressent pas. Histologiquement leur structure est le plus souvent testiculaire, dans quelques cas les cordons restent indifférenciés, sans présenter de lacunes.

Lorsqu'on ajoute au milieu C le mélange de vitamines indiqué précédemment (milieu C/2 + V 1), on ne constate aucune amélioration sensible au point de vue morphologique. Mais nous verrons plus tard que l'adjonction de vitamines au milieu confère aux organes une aptitude plus grande à faire de la croissance.

Conclusion. La survie et la différenciation morphologiques des gonades embryonnaires de poulet, prélevées à un stade qui précède de peu la différenciation sexuelle, sont très analogues à celles que nous avons obtenues sur le milieu Standard renfermant de l'extrait embryonnaire.

C. *Problème de la croissance des gonades embryonnaires de poulet en culture in vitro*

La croissance des gonades explantées en culture *in vitro* peut être contrôlée

histologiquement par la fréquence des mitoses observées sur les préparations histologiques, et mieux encore par la croissance pondérale des explants.

Ainsi que nous l'avons indiqué plus haut (p. 60) nous avons eu recours à une technique biochimique, celle du microdosage de l'Azote total, dérivée de la technique de Kjeldahl.

Si les gonades sont capables de synthétiser de la matière vivante à partir des éléments nutritifs absorbés dans le milieu, cette synthèse devra se traduire par une augmentation du taux de l'Azote total. Nous disposons ainsi d'un test quantitatif dont la valeur est incontestable.

Les testicules se sont révélés être le matériel le plus favorable à cette étude. Ils offrent l'avantage d'être des organes pairs. On évite ainsi un certain nombre de causes d'erreurs dues à des variations individuelles. L'un des testicules sert de témoin au moment du prélèvement, le partenaire correspondant est cultivé sur le milieu étudié. La durée de culture a été de trois jours. Au bout de ce temps, les testicules sont soigneusement détachés du milieu, à l'aide d'une léger courant

TABLEAU 1

Résultats des dosages d'Azote total de gonades cultivées sur milieux synthétiques et de leurs témoins au moment du prélèvement

Milieu étudié	Stade du prélèvement en jours	Sexe	Nombre d'organes par série	Durée de culture en jours	Teneur en N total en γ par gonade		Augmentation de N total en %
					au moment du prélèvement	après culture	
B/2	9	♂	10	3	3.3	3.8	+15
B/2	9	♂	8	3	5.8	4.5	-29
B/2	7½	♂ présumés	12	3	4.4	3.9	-13
B/2	7½	♂ "	7	3	3.1	2.8	-11
B/2	7½	♂ "	8	3	2.4	2.3	-4
C/2	9	♂	10	3	3.4	3.8	+12
C/2	9	♂	10	3	5.9	6.9	+17
C/2	8½	♀	8	3	6.1	4.6	-25
C/2	7½	♂ présumés	8	3	4.1	4.3	+5
C/2	7½	♂ "	8	3	3.1	3.2	+3
C/2+V 1	7½	♀ présumées	8	3	4.0	4.0	0
C/2+V 1	7½	♂ présumés	12	3	3.1	3.6	+16
C/2+V 1	7½	♂ "	6	3	3.8	4.8	+26
C/2+V 1	7½	♂	8	3	3.5	4.4	+25
C/2+V 1	7	indifférencié	8	3	1.3	1.7	+31
C/2+V 1	7½	♀ présumées	8	3	2.9	3.4	+17
C/2+V 1	7	indifférencié	8	3	3.1	3.2	+3
C/2+V 1	7	indifférencié	8	3	2.0	2.9	+5
Standard	9	♂	10	4	3.7	5.9	+60
Standard	9	♂	7	3	3.4	5.9	+74
Standard	7½	♀	12	3	3.6	4.9	+36
Standard	7½	♂	10	3	3.1	4.6	+48
Standard	7½	♂	8	3	2.4	3.9	+63
T	9	♂	6	3	3.5	2.0	-43

Erreur maxima: 5%

de Tyrode, puis lavés à l'eau distillée, avant d'être séchés et minéralisés. Chaque dosage a été effectué sur 6 à 12 organes. Quelques dosages ont également été effectués sur des gonades ♀. Les résultats des dosages sont résumés dans le tableau 1.

Nous avons pu constater: 1° des différences de croissance des gonades suivant le stade auquel a été fait le prélèvement; 2° des différences en rapport avec le milieu sur lequel elles ont été cultivées.

Les gonades, cultivées sur le milieu réduit au substratum de base (*T*) montrent une perte d'Azote considérable (43 pour cent). Lorsqu'elles sont prélevées après la différenciation sexuelle, au 10^e jour de l'incubation, et cultivées sur milieu *B/2*, elles ont fourni dans 1 cas un accroissement de l'N total. Dans tous les autres cas, quel qu'ait été le stade du prélèvement, elles accusent une perte de 4 à 29 pour cent.

Sur le milieu *C/2* l'augmentation d'Azote pour les gonades de 9 jours est de 12 à 17 pour cent.

Pour les gonades de 7 à 7 jours $\frac{1}{2}$, la teneur en N reste à peu près constante, compte tenu de l'ordre de précision de la méthode qui est d'environ 5 pour cent.

Sur le milieu *C/2* additionné de vitamines, l'augmentation d'Azote, mesurée sur des gonades de 7 $\frac{1}{2}$ à 8 jours, est de l'ordre de 16-31 pour cent. La teneur en N est stationnaire dans le cas des gonades prélevées à un stade plus jeune. Sur le milieu Standard naturel, la croissance des gonades de 7 à 9 jours d'incubation se traduit par une augmentation de l'Azote total de 36 à 74 pour cent.

Conclusion

Ces résultats corroborent ceux que nous avons observés du point de vue morphologique. On notera que la croissance pondérale, sans être aussi importante qu'en milieu Standard, est notable et accuse une assimilation certaine des acides aminés du milieu. Si l'on admet une erreur maxima de 5 pour cent sur les résultats des dosages, on voit que la croissance est particulièrement importante sur les milieux *C/2 + V 1*. On remarquera en outre que, dans tous les cas, elle est en réalité plus considérable que les chiffres ne l'indiquent, si l'on tient compte de ce qu'un organe qui paraît stationnaire assimile en réalité des éléments du milieu extérieur, pour compenser une désassimilation certaine. Les mêmes remarques s'appliquent aux résultats des chapitres suivants.

Si nous résumons brièvement les résultats obtenus avec les gonades cultivées sur des milieux synthétiques, nous pouvons dire que non seulement elles survivent, mais encore qu'elles continuent à croître et à se différencier.

II. *Culture de syrinx* (Em. Wolff)

Nous nous sommes adressés principalement à la syrinx embryonnaire de poulet, qui ne présente pas de dimorphisme sexuel, contrairement à celle de l'embryon de canard, que nous avons étudiée dans des travaux antérieurs (Em. Wolff, 1950; Et. Wolff & Em. Wolff, 1951). Ces recherches ont été faites à une période de

l'année où la ponte des canes était insuffisante pour nous permettre de continuer nos recherches. La syrinx de l'embryon de poulet, malgré l'absence de dimorphisme sexuel, est un bon test de la différenciation et de la croissance *in vitro*.

La syrinx de l'embryon de poulet est du type trachéo-bronchial, c'est-à-dire que son armature cartilagineuse est formée à la fois par des cartilages trachéens et par des cartilages bronchiaux. Au stade de 11 jours (Fig. 2), elle comprend du

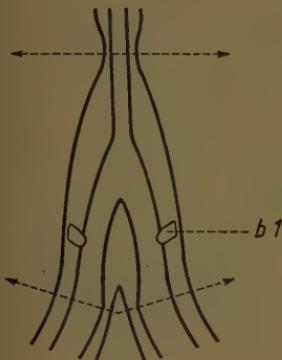


FIG. 1. Schéma du carrefour trachéo-bronchial d'un embryon de poulet de 7 jours $\frac{1}{2}$, montrant la formation de la première paire de condensations pré-cartilagineuses b_1 . Les flèches indiquent l'emplacement des sections au moment du prélèvement de l'organe.

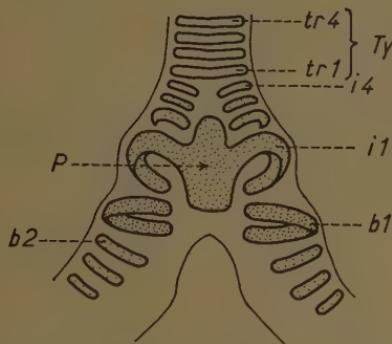


FIG. 2. Dessin d'après une photographie de la syrinx d'un embryon d'environ 11 jours d'incubation. La syrinx de l'adulte correspond à la zone comprise entre les anneaux tr_4 et b_1 . Les explants correspondent à la région comprise entre les arcs b_1 et i_4 . b_1 , b_2 : anneaux bronchiaux; i_1 à i_4 : anneaux intermédiaires; P : pessulus; tr_1 à tr_4 : anneaux trachéens formant le tympanum Ty .

haut en bas 4 arcs trachéens (i_4 à t_1), qui chez l'adulte donnent le tympanum, 4 arcs intermédiaires (i_4 à i_1), qui s'atrophient chez l'adulte, et une paire d'arcs bronchiaux b_1 . Les arcs i_1 et b_1 sont très volumineux. La pièce cartilagineuse la plus puissante de la syrinx est le pessulus (P), pièce impaire, à direction antéro-postérieure, à section triangulaire, qui cloisonne partiellement la syrinx en deux cavités symétriques, et dont les extrémités antérieure et postérieure sont en relief. Nous ne prélevons pas la zone des anneaux i_4 à t_1 et, pour simplifier, nous désignerons par syrinx l'ensemble correspondant aux futurs anneaux i_4 à i_1 , à b_1 , et au pessulus. C'est l'ébauche de cet ensemble (Fig. 1) qui a été prélevée à un stade plus ou moins précoce, soit avant la formation des premiers cartilages (stade 7 jours à 7 jours $\frac{1}{2}$), soit à un stade où les premiers anneaux b_1 et i_1 ainsi que P sont déjà ébauchés (stade 9 jours à 9 jours $\frac{1}{2}$), soit à un stade intermédiaire. L'ordre chronologique d'apparition des ébauches précartilagineuses de la syrinx chez l'embryon normal de poulet est, d'après Myers (1917) et d'après nos propres observations le suivant: b_1 à 7 j. $\frac{1}{2}$, i_1 à 8 j., i_2 et P à 8 j. $\frac{1}{2}$; à 9 j. $\frac{1}{2}$ i_1 et i_2 sont

soudés en avant à la pyramide antérieure du pessulus; $i3$ et $i4$ ne sont pas encore présents.

A. Evolution des explants prélevés avant la différenciation des cartilages (7 jours à 7 jours $\frac{1}{2}$)

Au stade de l'explantation, la syrinx est un léger renflement situé au carrefour trachéo-bronchial. Il est constitué du canal épithéial trachéo-bronchique entouré de tissu conjonctif. Un léger étranglement en marque la limite antérieure, tandis que la limite postérieure est caractérisée par une couture brusque, qui indique le niveau des futurs 2^e et 3^e arcs bronchiaux. L'organe est sectionné au niveau de ces repères, après décollement des tissus conjonctifs qui l'attachent aux organes voisins. Quand les organes sont prélevés à des stades très jeunes, la section se fait au niveau de l'ébauche future de l'anneau $b2$, qui se trouve ainsi éliminé. L'organe est transparent, très petit et entouré d'un voile conjonctif transparent. Aucune ébauche précartilagineuse n'est visible.

1. *Aspect morphologique.* (a) *Milieu naturel.* Le milieu naturel qui convient le mieux au développement de la syrinx comporte, en plus de l'extrait d'embryon contenu dans le milieu Standard, deux parties de serum (serum de cheval), ainsi que nous l'avons rapporté dans un travail antérieur (Et. Wolff & Em. Wolff, 1952b). Après 5 à 6 jours de culture, les organes explantés sont bien vivants; ils présentent 3 ou 4 paires d'arcs cartilagineux bien développés, renflés, comprenant $b1$, $i1$, $i2$ et $i3$. La pyramide antérieure du pessulus est bien en relief et les anneaux inférieurs ($i1$, $i2$), très saillants, sont soudés à cette pyramide; chaque paire de cartilages, vue du côté ventral, a l'aspect d'une accolade. Si l'on prolonge la culture, les anneaux supérieurs se soudent les uns après les autres au pessulus.

(b) *Milieux synthétiques.* Nous avons employé les milieux B/2, C/2, et C¹/2. Les résultats ont été sensiblement les mêmes sur les différents milieux (Pl. 2, A et B); toutefois les milieux C/2 et C¹/2 ont donné, dans plusieurs séries, des résultats plus favorables que B/2. Les explants ont évolué, dans de nombreux cas, pendant 5 et 6 jours. Les premiers cartilages apparaissent en moyenne après 24 heures: ce sont les arceaux $b1$. Viennent ensuite les arceaux $i1$, $i2$, $i3$. Ces arcs cartilagineux apparaissent dans le même ordre que dans le milieu Standard, qui est l'ordre du développement normal. Dans certains cas moins favorables, seuls les arcs $b1$ et $i1$ se différencient. Le pessulus se forme toujours, mais la pyramide antérieure est plus ou moins renflée.

En général, dans les milieux synthétiques, les anneaux, en se soudant au pessulus, ne prennent pas la forme d'une accolade qu'on observe sur le milieu Standard; ils ont l'aspect de demi-arceaux dont le relief est généralement moins accentué. Dans les milieux C/2 et C¹/2, les résultats sont plus constants, et la différenciation est la meilleure en milieu C¹/2, où le glutathion semble favoriser le développement des cartilages. Au point de vue statistique, les milieux C/2 et C¹/2 donnent un plus grand nombre de syrinx développant 4 paires de cartilages.

2. *Aspect histologique.* Des coupes séries ont été faites dans des syrinx cultivées pendant 3 à 5 jours sur les différents milieux synthétiques. Les différents tissus ont un aspect sain, à l'exception, dans certains cas, des lambeaux conjonctifs enveloppant l'organe au moment du prélèvement. L'épithélium trachéobronchique est constitué de hautes cellules cylindriques dans lesquelles on observe de fréquentes mitoses. Le tissu cartilagineux est bien différencié, les massifs cartilagineux sont bien délimités et entourés par quelques assises conjonctives denses formant le périchondre (Pl. 2, C). Ils ont l'aspect d'un jeune cartilage hyalin, dans lequel les chondroblastes sont plus ou moins évolués, certains d'entre eux étant en mitose.

Conclusion. Les syrinx, prélevées à l'âge de 7 jours à 7 jours $\frac{1}{2}$ d'incubation, avant la différenciation des cartilages, continuent leur développement morphologique et histologique dans les milieux synthétiques éprouvés. En particulier, le tissu cartilagineux se différencie; les arcs cartilagineux, le pessulus et ses pyramides s'individualisent et acquièrent leur forme caractéristique.

B. Evolution des explants prélevés après le début de la différenciation des cartilages (8 à 10 jours d'incubation)

Au moment du prélèvement, les cartilages ébauchés sont d'autant plus nombreux que l'embryon est plus âgé. Les explants les plus jeunes ont une paire d'ébauches précartilagineuses, formées de petits arcs très courts qui apparaissent latéralement et sont encore très peu réfringents (Fig. 1). A des stades ultérieurs, les ébauches précartilagineuses sont plus nombreuses et leurs extrémités ventrales s'approchent d'autant plus du pessulus que les embryons dont ils proviennent sont plus avancés dans leur développement.

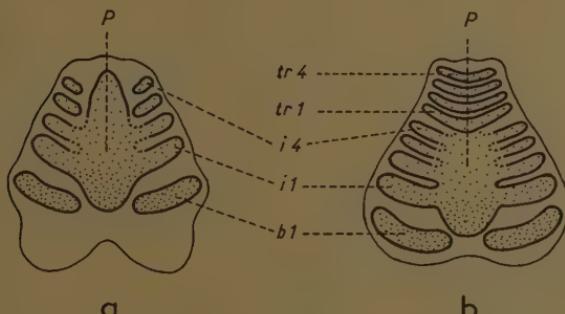


FIG. 3. Croquis de syrinx développées en milieu synthétique C/2, après 4 jours de culture. (a) Syrinx prélevée au stade de 7 jours $\frac{1}{2}$ d'après le croquis de la fig. 1. Différenciation des cartilages $b1$, $i1$, P , $i2$, $i3$ et début de la formation de $i4$. (b) Syrinx prélevée au stade de 8 jours $\frac{1}{2}$. L'organe prélevé correspondait à un territoire plus étendu que dans les expériences habituelles destinées aux dosages. Il contenait aussi les territoires présumptifs des anneaux trachéens, $tr1$ à $tr4$, qui se sont différenciés, en plus des arcs $b1$ et $i1$ à $i4$.

Aspect morphologique et histologique. Ces explants augmentent rapidement de volume et, comme nous le verrons plus loin, de masse. Les arceaux, qui étaient à peine ébauchés, deviennent des bourrelets massifs, très réfringents, qui se soudent à la pyramide antérieure du pessulus (Fig. 3a et b). Alors qu'ils n'étaient au début que des bandelettes très étroites laissant entre elles de larges espaces de tissu conjonctif, ils sont devenus des arcs volumineux et rapprochés. Seul l'espace entre b1 et il ne sera pas envahi par le cartilage et formera la future membrane tympaniforme externe.

TABLEAU 2

Dosage de l'Azote total au moment du prélèvement et à la fin de la culture des syrinx explantées (teneur en γ)

Milieu	Age de l'explant en jours	No. de témoins au départ	No. d'organes en culture	Durée de la culture en jours	Teneur en N total par org. au moment du prélèv.	Teneur en N total par org. après culture	Croissance en %
Standard W	7	8	8	3½	3·2	3·8	+18
Standard W	7	11	11	3	2·8	4·1	+46
B/2	7	8	8	4	2·6	3·4	+27
B/2	7	7	7	4	2·0	2·2	+10
B/2	7½	11	11	3	2·8	4·1	+46
B/2	7½	10	10	3	3·4	2·9	-14
C/2	7	11	10	3	2·8	2·9	+ 3
C/2	7½	10	9	3	3·4	2·8	-17
Standard W	9	14	7	4	4·1	6·2	+48
Standard W	9	15	6	6	4·2	5·3	+26
B/2	9	15	7	6	4·3	5·0	+16
B/2	9	15	7	6	4·3	5·4	+25
B/2	9	12	8	4	4·3	6·3	+46
B/2	9½	10	6	3	4·5	6·0	+33
C/2	9	12	12	4	4·3	5·0	+16
C/2	9	12	7	4	4·3	5·8	+34
C/2	9	14	6	4	4·1	3·7	- 9
C/2	9	12	8	4	4·2	2·9	-32

Erreur maxima: 5%

Ces résultats ont été obtenus sur les trois milieux éprouvés. D'autres cas, moins favorables, ont donné des résultats intermédiaires entre le stade de départ et celui qui vient d'être décrit. Les explants ont été suivis pendant une durée de 3 à 7 jours. Ils survivent et se développent d'autant mieux qu'ils ont été prélevés à un stade plus âgé. Dans ces conditions, la différenciation qu'on obtient en milieu synthétique est très analogue à celle qu'on observe sur le milieu Standard naturel; cependant la survie est de moins longue durée et les arcs ont moins de relief.

Au point de vue histologique, les explants ne présentent pas de grandes différences avec ceux qui ont été prélevés à des stades plus jeunes. La différenciation histologique des cartilages se poursuit (Pl. 2, D et E).

Conclusion. Les syrinx, explantées aux stades de 8 à 10 jours, poursuivent leur développement amorcé. La croissance en volume de l'ensemble de l'organe, des cartilages en particulier, est manifeste. Elle a été confirmée par des mesures quantitatives.

C. Problème de la croissance des syrinx de poulet en culture in vitro

Nous avons apprécié l'accroissement quantitatif des syrinx par la technique des dosages de l'Azote total utilisant l'ultra-microméthode de Kjeldahl. La teneur en Azote des organes au début de l'expérience a été évaluée dans chaque série sur des témoins, dont la moyenne fournit la mesure de départ. Les résultats se subdivisent en deux groupes (Tableau 2).

1. Les syrinx prélevées avant la différenciation des cartilages (7 à 7 jours $\frac{1}{2}$) ont donné des résultats variables. Dans certaines séries, le bilan est nettement positif, dans d'autres, il est négatif. Ces variations ne paraissent pas dépendre de la composition du milieu, puisqu'on obtient des résultats tantôt positifs, tantôt négatifs sur les milieux B/2 et C/2. Ils dépendent peut-être du stade réel du développement — les syrinx les plus jeunes et les plus éloignées de la différenciation des cartilages ayant plus tendance à la différenciation qu'à la croissance. En effet, dans des séries où la différenciation morphologique était très bonne, le bilan azoté était faiblement positif ou se soldait par une perte sensible (en particulier sur le milieu C¹). Il convient également de tenir compte des conditions générales de la culture, qui varient d'une expérience à l'autre, surtout dans le cas des jeunes organes.

2. Les syrinx prélevées après le début de la différenciation des cartilages (9 jours) montrent le plus souvent, en même temps qu'une bonne morphogenèse des explants, une augmentation notable de la teneur en azote. Les milieux B/2 et C/2 ont donné les meilleurs résultats, le milieu C¹/2 (qui contient du glutathion) n'a fourni jusqu'à présent qu'un bilan négatif, bien que, dans ce cas encore, il ait été favorable à la morphogenèse.

Conclusion

Nous apportons la preuve que des syrinx isolées sur des milieux synthétiques sont capables d'assimiler les acides aminés de ces milieux pour accroître leur substance. La croissance azotée n'est cependant ni aussi régulière ni aussi intense que sur les milieux naturels à base d'extrait d'embryon. Les cultures saines sur milieu naturel accusent toujours — et à tous les stades — un gain d'Azote plus ou moins élevé — tandis que des cultures synthétiques, même prospères, de jeunes organes, montrent parfois un déficit d'Azote. Il y a donc une différence d'efficacité entre les milieux naturels et les milieux synthétiques que nous avons éprouvés jusqu'à ce jour. C'est cette différence que nous nous proposons de réduire dans des expériences à venir, en tentant d'améliorer les milieux.

III. *Explantation de tibias (M. Kieny)*A. *Culture sur milieux naturels (Standard)*

Des tibias d'embryons de poulet ont été prélevés au 8^e jour d'incubation. Ils sont soigneusement débarrassés des tissus conjonctifs qui les entourent. Au moment du prélèvement ils sont à l'état d'ébauches cartilagineuses. Ils se présentent sous la forme de baguettes cartilagineuses dont les épiphyses sont encore faiblement



FIG. 4. Comparaison entre le développement de tibias de 7 jours sur milieu Standard naturel (a), sur milieu T glucose sans substances azotées (b), sur milieu B/10+P renfermant des acides aminés (c). La fig. 4b correspond à peu près au stade de départ, l'explant ne montrant ni morphogenèse ni croissance notable sur milieu T. La coudure des tibias sur les milieux naturels et synthétiques (fig. a et c) est due à la croissance en longueur qui ne peut s'effectuer librement sur le milieu de culture. Grossissement: $\times 6$.



FIG. 5. Résultat d'une expérience analogue à celle de la fig. 4. On remarque que la croissance en milieu synthétique (fig. 5c) est importante, mais n'atteint pas la valeur qu'elle prend en milieu naturel (fig. 5a).

Grossissement: $\times 7.5$.

renflées (Fig. 4b et 5b). Posés sur un milieu contenant de l'extrait embryonnaire de 7 à 12 jours (milieu Standard), les explants poursuivent leur morphogenèse. Les épiphyses acquièrent leur modèle et les facettes articulaires se dessinent comme chez l'embryon normal. La diaphyse s'allonge et très souvent on observe une coudure du tibia, due au fait que les épiphyses sont ancrées dans le milieu, et ne permettent pas à l'explant de s'allonger en ligne droite (Fig. 4a et 5a).

La croissance en longueur a été mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire. Ces mesures ont été effectuées chaque jour pendant toute la durée de la culture, qui était généralement de 7 jours. La longueur moyenne des tibias au moment de la mise en culture est de 4.4 mm.; celle des tibias après 7 jours de culture est de 7.0 mm. (voir courbe, Fig. 6). L'accroissement de longueur est de 58 pour cent.

L'augmentation pondérale a été mesurée à l'aide d'une microbalance permettant d'évaluer le $\frac{1}{10}$ de mg. Nous avons pesé le même organe au moment de l'explantation et après la culture. L'augmentation moyenne de poids est de 81 pour cent (Tableau 3). Le fait que cette croissance pondérale est due au moins

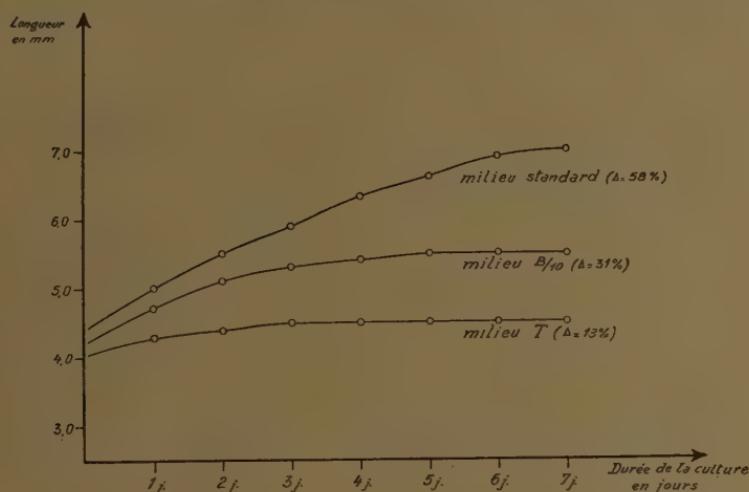


FIG. 6. Courbes représentant l'accroissement de longueur des tibias dans les milieux T (sans aliment azoté), B/10 (en présence d'acides aminés) et Standard (milieu à base d'extrait d'embryon). Δ = accroissement de longueur après 7 jours de culture.

en partie à des synthèses protéiques est attesté par les résultats des dosages de l'Azote total selon l'ultra-microméthode de Kjeldahl. L'augmentation de l'Azote total est de 55 à 91 pour cent après 7 jours, de 44 pour cent après 5 jours et de 41 à 51 pour cent après 3 jours de culture (Tableau 4).

B. *Explantation sur milieu physiologique dépourvu d'aliments azotés*

Les tibias explantés sur un milieu composé uniquement de gélose et de liquide physiologique, contenant du glucose et additionné d'une petite goutte de pénicilline¹ (milieu T + P), ne font aucune morphogénèse (Fig. 4b et 5b). Cependant la survie est bonne et on l'observe généralement jusqu'au 8^e jour après l'explantation. Une croissance minime a été mise en évidence par les méthodes décrites ci-dessus. L'accroissement en longueur est de 13 pour cent (moyenne au moment du prélèvement: 4.0 mm.; moyenne après la culture de 7 jours: 4.5 mm.). Cette moyenne de 4.5 mm. est déjà atteinte au 3^e jour de culture. Puis la courbe prend l'aspect d'un plateau. L'augmentation pondérale est de 4 pour cent. Bien que

¹ La solution employée est dissoute dans une solution de polyvinylpyrrolidone contenant de la novocaine (solution P).

TABLEAU 3
Accroissement de longueur et de poids des tibias

Milieu employé	No. de tibias par exp.	Longueur en mm						Poids en mg					
		au moment du prélèvement			après 7 jours de culture			au moment du prélèvement			après 7 jours de culture		
		long. totale de tous les tibias	long. moyenne d'1 tibia	long. totale de tous les tibias	long. moyenne d'1 tibia	allongement en %	Pds total de tous les tibias	long. totale de tous les tibias	long. moyenne d'1 tibia	Pds total de tous les tibias	Pds moyen d'1 tibia	Pds moyen d'1 tibia	augmentation pondérale en %
Standard	9	35.0	3.9	53.3	5.9	51	11.7	1.3	20.6	2.3	77		
	5	28.2	5.6	43.0	8.6	53	10.3	2.1	18.9	3.8	81		
	12	52.6	4.4	85.1	7.1	61	17.2	1.4	31.6	2.6	85		
Moyenne													+81%
B/10+P	9	40.0	4.4	52.5	5.8	32	11.7	1.3	16.1	1.8	36		
	7	28.4	4.1	38.5	5.5	39	8.5	1.2	10.9	1.6	33		
	8	34.2	4.3	44.1	5.5	28	10.4	1.3	13.2	1.7	33		
Moyenne													+34%
B/10	9	39.9	4.4	43.6	4.8	9	11.2	1.2	11.8	1.3	+ 5		
	3	13.3	4.4	14.7	4.9	11	4.3	1.4	4.2	1.4	- 2		
	8	35.4	4.4	40.3	5.0	13	11.1	1.4	10.4	1.3	- 6		
Moyenne													- 1%
C/10+P	6	25.8	4.3	33.2	5.5	+28%	7.5	1.2	9.6	1.6	+30%		
C/10	6	26.3	4.4	29.9	5.0	+13%	8.5	1.4	9.2	1.5	+ 8%		
T/1+P	9	36.1	4.0	40.1	4.5	+13%	9.9	1.1	10.3	1.1	+ 4%		
T		33.9	3.8	34.9	3.9	+ 3%	8.7	1.0	7.8	0.9	-10%		

non significative, cette croissance pourrait être due à un phénomène d'imbibition par l'eau du substratum. Après 7 jours de culture, les dosages effectués au moyen de l'ultra-microméthode de Kjeldahl nous ont donné une perte qui est de l'ordre de 13 à 23 pour cent.

Sur milieu T non additionné de la solution P, les tibias n'effectuent qu'une faible croissance linéaire et accusent une perte de poids de 10 pour cent.

TABLEAU 4

Résultats des dosages d'Azote total des tibias avant et après l'explantation

Milieu étudié	Stade en jours	No. d'organes par essai	Durée de la culture en jours	Teneur en N total par tibia en γ		Augmentation en %
				avant	après	
Standard	7	4	7	6.8	10.5	+55
Standard	7	4	7	5.8	9.6	+65
Standard	7	4	7	7.4	14.1	+91
Standard	7	4	7	6.1	9.7	+59
Standard	7	4	5	7.5	10.9	+44
Standard	7	4	3	9.1	12.8	+41
Standard	7	3	3	9.3	14.0	+51
B/10+P	7	4	7	9.7	8.8	-9
B/10+P	7	4	7	7.9	7.4	-6
B/10+P	7	4	5	7.8	7.0	-10
B/10+P	7	4	3	6.9	6.3	-9
B/10+P	7	4	3	8.3	7.2	-13
B/10+P	7	4	3	7.3	6.9	-5
B/10+P	7	4	3	7.7	8.2	+6
B/2+P	7	4	3	8.3	8.6	+3
B/10(-P)	7	4	7	9.3	6.5	-30
B/10(-P)	7	4	7	8.4	6.9	-18
B/10(-P)	7	4	5	9.6	6.6	-32
B/10(-P)	7	4	3	9.8	7.1	-29
C/10+P	7	4	7	7.7	6.8	-12
C/10(-P)	7	4	7	12.5	7.8	-37
C/10(-P)	7	4	7	11.8	8.9	-25
T+P	7	4	7	8.5	6.9	-19
T+P	7	4	7	10.0	7.7	-23
T+P	7	4	3	7.5	6.5	-13

Erreur maxima: 5%

C. Explantation sur milieux synthétiques à base d'acides aminés

Que devient la croissance, lorsque nous ajoutons au milieu T certains mélanges d'acides aminés?

Milieu B/10. Le mélange d'acides aminés de Bergmann, utilisé à la concentration de 1/10, s'est révélé beaucoup plus efficace dans le cas des tibias que la concentration 1/2 utilisée pour les explantations des gonades et des syrinx. Les tibias explantés continuent leur morphogenèse; comme sur le milieu Standard, les épiphyses se façonnent. On voit apparaître des facettes articulaires très

caractéristiques. La diaphyse s'allonge, ce qui se manifeste par une coudure notable de l'explant (Fig. 4c et 5c).

Après 7 jours de culture, l'accroissement de longueur est de 31 pour cent (moyenne au moment du prélèvement: 4,2 mm.; moyenne après la culture: 5,5 mm.). L'augmentation de poids est de 34 pour cent (Tableau 3). Malgré une bonne différenciation morphologique, un allongement et une augmentation pondérale des explants, nous n'avons jamais obtenu qu'une très faible augmentation de la teneur en Azote total des explants. Il y a plus souvent une légère perte, qui oscille autour de 7 pour cent (Tableau 4). On obtient de tels résultats quand on ajoute au milieu la solution pénicilline-polyvinylpyrrolidone-novocaïne (solution P). La perte en Azote est beaucoup plus importante (de l'ordre de 30 pour cent), lorsque cette solution n'est pas ajoutée au milieu B/10.

Milieu C/10. L'incorporation d'autres acides aminés dans le substratum de base ne s'est pas révélée plus efficace dans le cas des tibias. Même l'adjonction d'une solution de vitamines n'a pas eu un effet positif dans le sens d'une augmentation de la teneur en Azote total. L'allongement après 7 jours de culture est de 28 pour cent; l'augmentation pondérale de 30 pour cent.

On remarquera que, dans tous les milieux synthétiques, l'adjonction de la solution P (pénicilline-polyvinylpyrrolidone-novocaïne) favorise le développement, c'est à dire la différenciation morphologique, la croissance linéaire, et l'augmentation pondérale. D'autre part la perte des explants en Azote est beaucoup moins importante en présence de cette solution qu'en son absence. Nous savons actuellement que c'est la *novocaïne* qui produit cet effet adjuvant sur la croissance et la différenciation. Cette action sera décrite en détail et discutée dans des travaux ultérieurs.

D. Développement histologique

Pour l'étude histologique du tibia au moment de la mise en culture et après l'explantation de 7 jours, l'organe a été fixé dans du liquide de Bouin, coupé à 5 μ , et coloré selon la coloration trichromique de Masson. Afin d'éviter la décoloration des coupes, elles ont été montées au baume salicylé oxydé.

Les noyaux sont noirs, le cytoplasme est coloré en rouge, et les plus fines fibre collagènes sont colorées en bleu intense.

(a) *Aspect histologique de l'explant au moment de la mise en culture.* Au 8^e jour d'incubation (stade 30-32 de Hamburger & Hamilton, 1951), les 3 zones cellulaires caractéristiques de l'évolution du cartilage, décrites par Fell (1925), sont déjà indiquées.

Zone 1. Les cellules du centre de la diaphyse sont hypertrophiées. Elles sont polyédriques et ne montrent aucun arrangement particulier. On y distingue de temps en temps de petits espaces intercellulaires dénotant que la formation de la matrice cartilagineuse a déjà commencé. Quelques cellules montrent déjà des modifications dues à la dégénérescence: chromatolyse et désintégration partielle du cytoplasme.

Zone 2. Cette zone se situe de chaque côté de la première; elle est constituée de cellules aplatis, allongées perpendiculairement au grand axe de la masse cartilagineuse, qui prend ainsi l'aspect d'une colonne striée transversalement.

Zone 3. La troisième zone est la région épiphysaire, qui est composée, en majorité, de cellules rondes, à grande activité prolifératrice. Vers les extrémités de cette zone, les cellules sont très rapprochées; à la surface, elles deviennent légèrement aplatis, délimitant ainsi le cartilage épiphysaire des tissus conjonctifs environnants, non encore différenciés.

(b) *Evolution de l'explant sur milieux synthétiques ou naturels.* L'évolution des tibias sur milieux synthétiques ne se distingue guère de celle des explants sur milieu Standard sur lesquels nous avons vérifié les observations de Fell (1928). La seule différence réside dans une plus faible extension de la zone hypertrophiée, entraînant une moindre croissance.

Après 7 jours de culture, les trois zones cellulaires sont toujours distinctes. Les cellules hypertrophiées de la zone 1 ont augmenté d'environ trois fois leur volume (Pl. 2, F.). Des cellules binucléées sont assez fréquentes; on en rencontre également sur des coupes de tibia d'embryon de poulet de 8 jours à 8 jours $\frac{1}{2}$. L'hypertrophie cellulaire caractéristique de la zone 1 s'étend à la zone 2; les cellules aplatis ont perdu leur aspect comprimé, elles sont vacuolisées et hypertrophiées. Les cellules de la région épiphysaire ont également grandi, mais dans de plus faibles proportions. Au centre de l'épiphysé, on distingue très nettement, en milieu Standard, une plage, dont les cellules s'ordonnent selon des lignes elliptiques (Pl. 2, G). Ce sont des cellules d'aspect hypertrophié et le maximum d'hypertrophie se rencontre au centre de l'ellipse. Cette configuration, qui n'est pas encore indiquée sur une coupe de tibia d'embryon de poulet de 7 jours, se rencontre aussi sur le milieu B/10, avec cette différence que les cellules du centre de l'ellipse sont en moins bon état.

Ainsi la croissance du tibia, en culture *in vitro*, s'effectue conformément à sa croissance dans l'embryon normal: elle est due à l'extension de la zone des cellules hypertrophiées, à une dilatation des cellules épiphysaires et au développement de la substance fondamentale.

Jusqu'à présent nous n'avons pas encore observé de processus d'ossification dans les milieux synthétiques éprouvés.

(c) *Evolution de l'explant sur milieu T + P.* Nous avons vu que des tibias d'embryon de poulet de 7 jours, explantés sur milieu T + P, après 7 jours de culture ne font qu'une légère croissance (13 pour cent).

Les investigations histologiques ont montré que la diaphyse est toujours en bon état, mais que parfois la région épiphysaire est partiellement nécrosée. Les cellules de la zone diaphysaire continuent leur dégénérescence.

Conclusion

Les tibias d'embryons de poulet, explantés au 8^e jour de l'incubation, continuent leur morphogenèse et leur différenciation en milieux synthétiques. Ils

croissent en longueur et augmentent leur poids dans des proportions importantes, mais inférieures à celles qu'on observe sur les milieux naturels. Cette croissance n'est pas corrélative d'une augmentation de l'Azote total, elle ne peut donc être attribuée à un enrichissement du cartilage en matières protidiques. On doit bien plutôt l'attribuer à une absorption d'eau et de sels minéraux. Ce comportement est différent de ce qu'on observe sur le milieu Standard naturel où les explants montrent une augmentation notable de l'Azote total.

On remarquera enfin le rôle prépondérant que joue la novocaine dans les phénomènes de croissance linéaire et pondérale du tibia cartilagineux. Elle seule rend les milieux B et C plus efficaces que le milieu T dépourvu d'acides aminés. La présence de cette substance dans les milieux B et C réduit la perte azotée des explants (- 7 pour cent en moyenne) par rapport à la perte azotée qu'on observe dans les milieux qui en sont dépourvus (de l'ordre de 30 pour cent). D'autre part, en présence de cette substance, en milieu B et C, la perte azotée est inférieure à ce que l'on observe sur le milieu T additionné de cette même substance. On peut conclure de ces résultats que la novocaine n'agit pas seule, mais en collaboration avec les acides aminés des milieux B et C. Ces résultats plaident en faveur d'une assimilation des acides aminés par l'explant, si les processus de désassimilation restent les mêmes dans le bilan azoté. La désassimilation l'emporte encore dans la plupart des cas sur l'assimilation, mais celle-ci augmente toutefois et compense en grande partie la perte azotée. Ces résultats seront rapportés et discutés en détail dans des travaux ultérieurs.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Partant de nos recherches sur la culture d'organes en milieux contenant de l'extrait embryonnaire, nous avons tenté de cultiver des organes embryonnaires de poulet sur des milieux artificiels, composés exclusivement de sels minéraux, de glucides, d'acides aminés, éventuellement de vitamines. Ces milieux synthétiques, qui ne contiennent en principe que des composés chimiquement définis, ont permis la survie, la différenciation et la croissance des organes explantés. La différenciation est attestée par la morphogenèse externe des explants et par leur structure histologique. Elle diffère peu, chez l'embryon de poulet, du développement que nous avons obtenu sur des milieux naturels à base d'extrait d'embryon.

Les problèmes de la différenciation

(a) *Gonades.* La différenciation des gonades s'effectue ou se poursuit sur les milieux synthétiques comme sur le milieu 'Standard' naturel. Elle est toutefois un peu moins accusée. Il convient de noter que, dans les deux cas, elle est atypique en ce qui concerne les gonades ♀ : celles-ci évoluent toujours en ovo-testis, comprenant une médullaire testiculaire et un cortex ovarien. Le problème posé par cette différenciation atypique ne concerne cependant pas les recherches qui viennent d'être exposées. L'essentiel est que l'on obtienne une différenciation

norphologique et histologique, et que celle-ci soit de même nature qu'en culture sur milieu 'naturel'.

Nous ne pouvons cependant omettre d'évoquer des recherches, encore fragmentaires, qui ont été entreprises sur l'embryon de canard, et dont les résultats sont quelque peu différents (Et. Wolff, K. Haffen & Em. Wolff, 1952). Rappelons que les gonades indifférenciées de l'embryon de canard, explantées sur le milieu 'Standard' naturel, se différencient typiquement, conformément à leur sexe génétique. Pourtant, ces mêmes gonades, cultivées sur le milieu synthétique B/2, ont donné dans certains cas une différenciation atypique: en particulier les gonades ♂ ne différencient pas de tubes testiculaires et conservent un épithélium germinatif épais, ébauche d'un cortex. Il est difficile de dire si elles demeurent à l'état indifférencié ou si elles évoluent dans le sens ♀. Ces recherches, qui seront poursuivies, posent en tout cas le problème suivant: peut-on arrêter ou changer la différenciation sexuelle d'une gonade en agissant sur les constituants du milieu? Peut-on intervenir dans le chimisme de cette différenciation par l'intermédiaire d'autres facteurs que les hormones sexuelles dont on sait le rôle prépondérant dans le développement normal?

(b) *Syrinx*. La syrinx de l'embryon de poulet, qui, à l'inverse de celle de l'embryon de canard, ne présente aucune différence sexuelle, a été prélevée soit avant, soit après le stade de la formation des cartilages. La différenciation des cartilages s'amorce ou se poursuit, suivant les cas, dans les cultures en milieu synthétique. La morphogenèse est très analogue à celle qu'on obtient sur les milieux naturels; elle correspond à une certaine phase de la différenciation normale. Remarquons que le développement *in vitro* va d'autant plus loin, que l'explant est pris à un stade plus avancé. D'autre part, la différenciation des cartilages ne s'effectue correctement que lorsque le prélèvement précède de peu le stade normal de leur formation. Il semble, dans ce cas comme dans d'autres, que l'explant ne puisse franchir qu'un certain degré de différenciation, comme si son élan s'épuisait ou comme s'il n'avait en lui que les facteurs lui permettant de parcourir l'étape prochaine du développement. Cette remarque s'applique, dans l'état actuel de nos recherches, aussi bien aux cultures en milieu naturel qu'aux cultures en milieu synthétique. Il serait intéressant d'obtenir une évolution prolongée des explants et de déterminer les facteurs des étapes successives de la morphogenèse.

(c) *Tibias*. Les tibias ont été prélevés et isolés à un stade où ils existent déjà à l'état de baguettes cartilagineuses. Leur différenciation morphologique se continue *in vitro* dans les milieux synthétiques comme dans les milieux naturels. La diaphyse s'allonge, ce qui se manifeste à première vue par leur courbure; les épiphyses, d'abord peu renflées et sans relief, s'épaissent et acquièrent leur modèle normal, leurs condyles et leurs facettes articulaires (Fig. 4c et 5c). Leur croissance, leur développement morphologique sont évidents et cependant ces phénomènes ne correspondent pas à un accroissement de l'Azote total des explants. Cette modalité de croissance sera discutée dans le paragraphe suivant.

Les problèmes de la croissance

La croissance a été démontrée par la présence de mitoses dans les tissus, par des pesées, par le dosage de l'Azote total d'organes prélevés avant et après l'expérience. Cette dernière technique est une épreuve décisive de l'assimilation des substances quaternaires par les explants. Elle a été positive pour les gonades sur un milieu bien défini (C/2), pour les syrinx sur plusieurs milieux (B/2 et C/2), mais elle n'est bien assurée que si le prélèvement a eu lieu après un certain stade du développement; elle a été négative pour les tibias au stade de l'expérience, bien que ceux-ci aient montré une nette augmentation pondérale. Ces trois résultats posent des problèmes distincts et ouvrent la voie à de nouvelles recherches.

(a) *Les besoins spéciaux des organes explantés.* Il semble que certains milieux soient plus favorables que d'autres à la croissance des organes explantés. Mais les différents milieux soumis à l'expérience font apparaître des variations suivant les besoins des différents organes. Le milieu C/2 qui contient 21 acides aminés favorise la croissance des gonades, alors que le milieu B/2, qui ne comporte qu'un certain nombre de ces composés, lui est défavorable. L'addition de vitamines au milieu C/2 stimule la croissance. Au contraire, les milieux B/2 et C/2 ont été tous deux favorables à la croissance des syrinx de 9 jours. Le milieu C¹/2, qui contient en outre du glutathion, paraît favorable à la différenciation, mais défavorable à la croissance de ces mêmes organes.

Les ébauches cartilagineuses des tibias ne s'accroissent sur les milieux B et C qu'en présence d'une substance adjuvante, la novocaïne, qui n'est probablement qu'un des représentants d'un groupe de composés stimulateurs de la croissance. La concentration des solutions d'acides aminés qui s'est révélée favorable à la croissance des gonades et des syrinx ne convient pas aux tibias — et réciproquement. On voit que les milieux interviennent non seulement par leur composition qualitative, mais aussi par les proportions de leurs constituants. On peut se demander quels sont les besoins communs des différents organes, et quels sont leurs besoins spéciaux en acides aminés. Nos recherches ne sont encore qu'à leur début, mais elles font apparaître que ces besoins sont différents, que certains organes sont plus exigeants que d'autres. La tâche à venir sera de préciser ce que nous ne faisons qu'entrevoir.

Il convient encore de remarquer qu'en aucun cas la croissance des explants n'a été aussi bonne en milieu synthétique qu'en milieu naturel. Le but de recherches ultérieures sera d'améliorer nos résultats et d'essayer de définir des milieux synthétiques aussi efficaces que les milieux naturels, en même temps que de déterminer les besoins spécifiques des différents organes. Comme ceux-ci sont des ensembles complexes, il conviendra encore de déterminer les besoins respectifs de leurs constituants. Ainsi dans une gonade, le cortex et la médullaire, nous le savons déjà (Et. Wolff & K. Haffen, 1952e), ne se comportent pas de la même manière sur un milieu défini, qui peut suffire à l'un, mais non à l'autre.

(b) *Croissance et différenciation.* Nos premières recherches ont abouti à deux résultats distincts: la différenciation et la croissance. On remarquera que, si l'un et l'autre ont été obtenus sur un même milieu pour un même organe, ils ne sont pas nécessairement liés l'un à l'autre. Au contraire, certains milieux ont été favorables à la différenciation et non à la croissance (par exemple le milieu C¹ en ce qui concerne la syrinx). D'autre part les organes, prélevés avant une certaine étape de la différenciation, par exemple avant l'apparition des cartilages de la syrinx ou la différenciation sexuelle des gonades, effectuent cette différenciation mais ne s'accroissent que faiblement. Prélevés après cette étape, les organes montrent une croissance plus importante. Ils continuent du reste à effectuer la différenciation commencée. Il semble que l'amorçage d'une différenciation soit un obstacle difficile à franchir pour un organe en culture. Quand il a surmonté cette difficulté, il continue à s'accroître. Au contraire, une différenciation amorcée se poursuit aisément et s'accompagne d'une croissance notable. Les mêmes remarques sont valables pour les organes explantés en milieux naturels — à cette différence près que les résultats sont en général meilleurs et la survie plus longue. Mais, dans tous les cas, la différenciation et la croissance ne paraissent pas contemporaines. Chaque étape nouvelle de la différenciation semble absorber toute l'énergie que l'explant puise dans le milieu ou garde en réserve. Au contraire une différenciation amorcée se poursuit aisément et s'accompagne de croissance; il en est ainsi du cortex ovarien, des structures testiculaires, des cartilages de la syrinx. La présence d'un ou deux nodules cartilagineux de chaque côté de la syrinx semble déclencher la progression des cartilages vers la ligne médiane et la formation de nouveaux arcs cartilagineux, comme si l'apparition d'une première structure catalysait la propagation de cette différenciation.

(c) *Croissance pondérale et bilan azoté.* La culture des tibias nous donne un exemple de croissance linéaire et pondérale sans augmentation de l'Azote total. Dans les cas les plus favorables, la teneur en Azote des explants ne varie pratiquement pas (cas du milieu B/10 après 3 jours de culture), dans les autres, elle diminue notablement. Dans les cultures en milieu naturel, l'augmentation de poids est au contraire accompagnée d'un accroissement considérable de l'Azote total.

Comment expliquer une croissance qui n'est pas accompagnée d'une synthèse de matières protéiques? Il est vraisemblable qu'elle est due à un enrichissement en eau et en sels minéraux, et qu'elle se réduit principalement à un phénomène d'imbibition. Il est remarquable de constater que les organes effectuent toutefois une morphogénèse et une croissance spectaculaires.

En comparant les résultats des différentes séries expérimentales, on notera que le bilan azoté n'est cependant pas entièrement négatif. Une substance adjuvante, la novocaïne, qui contient dans sa molécule une vitamine, l'acide para-aminobenzoïque, non seulement favorise la croissance pondérale, mais encore elle diminue la perte azotée des explants cultivés en milieux synthétiques.

Ceux-ci sont donc plus favorables à tous égards que le milieu de base T dépourvu d'acides aminés. On peut se demander si l'effet de cette substance est simplement de favoriser l'absorption de l'eau et des sels minéraux. Cette explication est insuffisante, puisque la novocaine, ajoutée au milieu T, dépourvu de substances azotées, ne favorise qu'une très faible croissance pondérale. On peut donc envisager l'hypothèse suivante.

L'équilibre assimilation-désassimilation se solde par une perte azotée plus ou moins importante suivant le milieu éprouvé. Dans le cas du milieu B/10, en présence de novocaine, la désassimilation est en grande partie compensée par l'assimilation des acides aminés du milieu. On peut donc considérer que, si l'assimilation ne compense pas entièrement la désassimilation (dont le taux est donné par les cultures en milieu T + P, c'est à dire 13 à 23 pour cent), elle est toutefois importante, puisque la perte azotée se réduit à une moyenne de 7 pour cent. Cet effet peut s'expliquer par une utilisation des acides aminés du milieu pour des synthèses protéiques. Les recherches en cours tendent à améliorer les milieux synthétiques, de manière à faire pencher la balance en faveur de l'assimilation des substances azotées.

Les autres organes explantés — gonades et syrinx — nous ont donné au contraire un accroissement caractéristique de l'Azote total — dans des conditions bien définies de stade et de milieu. Ils apportent la preuve décisive d'une assimilation réelle des acides aminés du milieu synthétique. Sans doute cette augmentation n'est pas aussi importante qu'en milieu naturel. De plus elle s'arrête après 3 à 5 jours d'explantation, et l'organe est voué tôt ou tard à la nécrose. Quels que soient les facteurs internes ou externes qui favorisent cette croissance — et nous avons vu qu'on ne peut négliger le capital de substances de croissance, de vitamines, de diastases, d'hormones que l'organe explanté peut apporter avec lui — nous pensons avoir démontré que la culture organotypique est possible en milieux synthétiques.

RÉSUMÉ

1. De nombreux organes embryonnaires peuvent être cultivés *in vitro* sur le milieu d'Et. Wolff et K. Haffen, à base de glucose et d'extrait embryonnaire (milieu Standard). Peut-on substituer à l'extrait embryonnaire un mélange défini d'acides aminés, et réaliser ainsi la culture d'organes en milieux synthétiques? Le présent travail apporte les premiers résultats de tels essais.

2. Plusieurs mélanges, renfermant un plus ou moins grand nombre d'acides aminés (solutions B, C, C¹, pages 58 et 59), ont été ajoutés au substratum de base contenant du glucose comme aliment ternaire. Des vitamines et une substance adjuvante (novocaine) ont été ajoutées dans certains cas au milieu. Les résultats de ces essais ont été comparés d'une part aux cultures sur le milieu Standard naturel, d'autre part aux phénomènes de simple survie que l'on observe sur le substratum de base.

3. Trois catégories d'organes ont été explantées: les gonades, les syrinx, les

tibias d'embryons de poulet âgés de 6 à 10 jours d'incubation. Les tests qui permettent d'apprécier l'efficacité des milieux sont, outre la survie, la différenciation et la croissance.

4. Les gonades, prélevées avant ou après le stade de la différenciation sexuelle, amorcent ou continuent leur différenciation; leur morphogénèse externe et leur structure histologique sont très voisines de celles que l'on observe en milieu standard naturel. Leur croissance, particulièrement nette quand les gonades sont explantées au 9^{ème} jour, est attestée par les mitoses et par la croissance tissotée (de 5 à 30 pour cent), conséquence de l'assimilation des acides aminés du milieu.

5. Les syrinx ont été prélevées soit avant, soit après la différenciation des premiers nodules précartilagineux. Elles effectuent cette première différenciation ou la complètent, si elle est amorcée. Quatre ou cinq paires d'arcs cartilagineux apparaissent successivement dans l'ordre de leur formation normale; ils progressent des côtés vers la ligne médiane où se différencie le cartilage du pessulus. La croissance, particulièrement nette sur les explants prélevés au 9^{ème} jour, est attestée par les mitoses et par l'augmentation de la teneur en Azote (de 10 à 45 pour cent).

6. Les tibias, prélevés à l'âge de 7 jours à l'état de baguettes cartilagineuses, continuent leur différenciation morphologique et histologique sur les milieux synthétiques. Leur croissance linéaire et pondérale est importante (augmentation de poids de 30 à 35 pour cent) sur les milieux additionnés d'une substance adjuvante (la novocaïne). Cette croissance pondérale n'est cependant pas accompagnée d'un enrichissement en Azote des explants. La novocaïne, en réduisant considérablement la perte azotée, paraît favoriser toutefois l'assimilation des acides aminés par l'explant.

7. Les différents organes, cultivés en milieux synthétiques ont des besoins différents en acides aminés. Ils ont de même des besoins différents en vitamines et en substances de croissance.

8. La croissance et la différenciation ne sont pas corrélatives. Des modifications du milieu semblent favoriser tantôt l'un tantôt l'autre de ces processus. Les résultats obtenus jusqu'à présent démontrent qu'un organe, isolé sur un milieu synthétique, peut utiliser pour son développement certains acides aminés parmi eux qui lui sont fournis. Dans l'état actuel de nos recherches, cette évolution porte sur une étape limitée du développement.

SUMMARY

1. Many embryonic organs have been cultivated in the 'standard' medium of Wolff and K. Haffen which contains glucose and embryo extract as nutrients. The researches reported in this paper give the first results of experiments designed to find out whether it is possible to replace this extract by definite mixtures of amino-acids and thus to realize the culture of organs in synthetic media.
2. Several mixtures, containing a greater or lesser number of amino-acids

(solutions B, C, and C¹, see pp. 58–59), were added to a substrate consisting of agar, saline, and glucose. Vitamins and one stimulating substance (novocaine) were added to the media in some cases. The results of these experiments were compared with those in which the standard medium was used and with those in which organs were explanted on the basic substrate.

3. Three kinds of organ were explanted: gonad, syrinx, and tibia from chick embryos of from 6 to 10 days' incubation. The efficiency of the synthetic media was tested by three criteria: survival, differentiation, and growth of the explant.

4. Gonads explanted in synthetic media either before or after the stage of sex differentiation begin or continue their differentiation. Morphogenesis and histogenesis are similar to those observed in the standard medium. Clear-cut evidence of growth is given by mitoses and by an increase in total N, estimated by an ultra-micro-Kjeldahl method, which indicates an assimilation of amino-acids by the explanted organs.

5. Syrinxes were explanted both before and after the formation of the first pre-cartilaginous nodules of the tracheo-bronchial arches. They begin, or if already begun they complete, this first differentiation. Four to five pairs of arches are formed in latero-median succession. Growth of the organs was demonstrated by the presence of mitoses and by the increase in total N.

6. Tibias explanted at the 8th day of incubation as cartilaginous rods continue to differentiate morphologically and histologically in synthetic media to which novocaine had been added as a stimulatory substance. Considerable growth in length and weight occurred, but no increase in total N was associated with it. Nevertheless in the presence of novocaine the catabolism of N is partly compensated for by the assimilation of amino-acids.

7. Different organs, cultured in synthetic media, do not have the same needs for amino-acids, for vitamins, or for growth-promoting substances.

8. Growth and differentiation are not necessarily correlated. One or the other of these phenomena may be favoured by certain changes in the medium. From the results reported in this paper it may be concluded that organs isolated *in vitro* are able to assimilate amino-acids from a synthetic medium for a limited period of growth and development.

TRAVAUX CITES

FELL, H. B. (1925). The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J. Morph.* **40**, 417–60.

— (1928). Experiments on the differentiation *in vitro* of cartilage and bone. *Arch. exp. Zellforsch.* **7**, 390–413.

FISCHER, A. (1941). Die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebezellen *in vitro*. *Acta physiol. Scand.* **2**, 143–88.

— ASTRUP, T., EHRENSVARD, G. & OEHLENSCHLAGER, V. (1948). Growth of animal tissue cells in artificial media. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **67**, 40–46.

HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49–92.

MORGAN, J. F., MORTON, H. & PARKER, R. C. (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **73**, 1–8.

MYERS, J. A. (1917). Studies of the syrinx of *Gallus domesticus*. *J. Morph.* **29**, 165–201.

SPRATT, N. T. (Jr.) (1949). Nutritional requirements of the early chick embryo. I. The utilization of carbohydrate substrates. *J. exp. Zool.* **110**, 273–98.

VENDRELY, R. (1947). Sur la détermination de quantités d'Azote purique de l'ordre de 10–40 gammes. Application aux acides nucléiques, nucléo-protéides, tissus, microorganismes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 95–100.

WHITE, P. R. (1946). Cultivation of animal tissue *in vitro* in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, **10**, 231–89.

WOLFF, EM. (1950). La différenciation sexuelle normale et le conditionnement hormonal des caractères sexuels somatiques précoces, tubercule génital et syrinx, chez l'embryon de canard. *Bull. biol.* **84**, 121–93.

WOLFF, EM. (1952). Sur la différenciation sexuelle des gonades de souris explantées *in vitro*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **234**, 1712–14.

— & HAFFEN, K. (1951). Sur les résultats de la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des oiseaux. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **145**, 1388–91.

— — (1952 a). Sur une technique permettant la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des oiseaux. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **234**, 1396–8.

— — (1952 b). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.* **10**, 463–72.

— — (1952 c). Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseau en culture *in vitro*. *J. exp. Zool.* **119**, 381–404.

— — (1952 d). Sur l'intersexualité expérimentale des gonades embryonnaires de canard cultivées *in vitro*. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **41**, 184–207.

— — (1952 e). Sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de l'embryon de poulet en culture *in vitro*. *Ann. Endocrinol.* **13**, 724–31.

— — KIENY, M., & WOLFF, EM. (1953). Sur la culture d'organes embryonnaires en milieu synthétique. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **236**, 137–9.

— — & WOLFF, EM. (1953). Les besoins nutritifs des organes embryonnaires sexualisés en culture *in vitro*. *Ann. Nutr.*, **Paris** **7**, 5–22.

— & LUTZ-OSTERTAG, Y. (1952). La différenciation et la régression des canaux de Müller de l'embryon de poulet en culture *in vitro*. *C.R. Ass. Anat.* **72**, 214–29.

— & WOLFF, EM. (1951). The effects of castration on bird embryos. *J. exp. Zool.* **116**, 59–97.

— — (1952 a). Sur la différenciation *in vitro* du tubercule génital de l'embryon de canard. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **146**, 492–3.

— — (1952 b). Le déterminisme de la différenciation sexuelle de la syrinx du canard cultivée *in vitro*. *Bull. biol.* **86**, 325–50.

— — & HAFFEN, K. (1951). Sur la différenciation *in vitro* de la syrinx chez l'embryon de canard. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **233**, 500–2.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

FIG. A. Gonades gauche et droite d'un embryon de poulet de 8 jours $\frac{1}{2}$ après 5 jours de culture sur milieu C/2 + V 1. La gonade gauche a l'aspect caractéristique d'un ovaire (noter la large frange transparente correspondant au cortex), la gonade droite a l'apparence d'un testicule. Grossissement: $\times 22$.

FIG. B. Gonade gauche d'un embryon de poulet de 8 jours après 5 jours de culture sur milieu C/2. Aspect testiculaire caractéristique. Grossissement: $\times 22$.

FIG. C. Coupe à travers un testicule prélevé à 8 jours, cultivé pendant 5 jours sur milieu synthétique C/2 + V 1. Nombreux cordons fertiles, d'aspect testiculaire typique, mais dont la lumière est encore étroite. Grossissement: $\times 175$.

FIG. D. Ovaire d'un embryon de 8 jours, cultivé pendant 4 jours sur milieu C/2. Cortex ovarien stérile. Grossissement: $\times 225$.

FIG. E. Vue générale d'une coupe d'ovaire, prélevé à 9 jours $\frac{1}{2}$ et cultivé pendant 5 jours sur milieu 'Standard' naturel. Le cortex ovarien (en bas) est normal et fertile. Par contre, la médullaire

se différencie toujours atypiquement en tubes testiculaires. L'aspect général est celui d'un ovotestis. En haut, quelques tubes du mésonéphros. Grossissement: $\times 75$.

FIG. F. Détail d'un ovaire, prélevé à 7 jours $\frac{1}{2}$, cultivé pendant 5 jours sur milieu C/2 + V 1. Même structure générale d'ovotestis que sur la fig. E. On voit, en bas, le cortex ovarien, contenant de nombreuses ovogonies. Au centre, tubes testiculaires, également fertiles, mais moins différenciés que ceux de la fig. E. En haut, une lacune de la médullaire. Grossissement: $\times 220$.

PLANCHE 2

FIG. A. Syrinx d'embryon de poulet prélevée à 8 jours d'incubation, après 4 jours de culture sur milieu B/2. On voit, de bas en haut, les arcs cartilagineux b_1 , i_1 , i_2 , i_3 . Les arcs i_1 s'unissent aux cartilages du pessulus qui forment une masse sombre sur la ligne médiane. Grossissement: $\times 27$.

FIG. B. Syrinx prélevée au stade de 8 jours $\frac{1}{2}$ et cultivée pendant 4 jours sur milieu C¹/2. On voit, de bas en haut, les 5 paires de cartilages b_1 , i_1 à i_4 en voie de développement, ainsi que la masse du pessulus sur la ligne médiane. Grossissement: $\times 27$.

FIG. C. Coupe transversale d'une syrinx prélevée au stade de 8 jours $\frac{1}{2}$ et cultivée 3 jours sur milieu B/2. On voit, au milieu en haut, le cartilage du pessulus en forme de T, qui pénètre dans la cloison médiane et sépare les deux cavités tapissées par l'épithélium trachéo-bronchial. On voit en outre deux anneaux cartilagineux latéraux. Grossissement: $\times 65$.

FIG. D. Coupe tangentielle antéro-postérieure d'une syrinx prélevée au stade de 9 jours et cultivée 4 jours sur milieu C/2. On voit, en bas, la section de 3 anneaux intermédiaires (i_1 à i_4), en haut, autour de la lumière de la trachée, 4 petits anneaux trachéens. Grossissement: $\times 65$.

FIG. E. Détail d'une coupe de syrinx cultivée en milieu synthétique C/2 montrant la différenciation de l'un des arcs cartilagineux. On voit, en haut, l'épithélium stratifié trachéo-bronchial, en bas, l'épithélium très mince, d'origine conjonctive, que revêt l'organe en culture. Grossissement: $\times 175$.

FIG. F. Coupe longitudinale à travers la diaphyse d'un tibia d'embryon de poulet, prélevé au stade 7 jours et explanté *in vitro* pendant 7 jours en milieu synthétique. Cellules vacuolisées et hypertrophiées de la zone 1, dont le noyau subit la chromatolyse normale, noyées dans la matrice cartilagineuse. Grossissement: $\times 85$.

FIG. G. Coupe longitudinale dans la région de l'épiphysé d'un tibia d'embryon de poulet, prélevé après 7 jours d'incubation et cultivé pendant 7 jours sur milieu synthétique. Le centre de l'épiphysé (zone 3) montre un amas de petites cellules rondes — en voie d'hypertrophie. La zone intermédiaire montre des cellules à noyau comprimé, de plus en plus espacées dans la masse cartilagineuse. Grossissement: $\times 85$.



ET. WOLFF, K. HAFFEN, M. KIENY & EM. WOLFF
Planche I



A



B



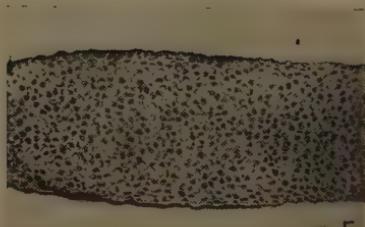
C



D



E



F



G

ET. WOLFF, K. HAFFEN, M. KIENY & EM. WOLFF
Planche 2

Development and Structure of the Saccus Vasculosus of *Scylliorhinus caniculus* (L.)

by J. C. VAN DE KAMER and A. J. SCHUURMANS¹

From the Zoological Laboratory, Utrecht (Director, Professor Chr. P. Raven)

WITH TWO PLATES

INTRODUCTION

THE excellent work of K. W. Dammerman (1910) on the saccus vasculosus of fishes has hitherto been the main source of our knowledge about the morphology, the histology, and the comparative anatomy of this organ, which develops as a protrusion of the infundibular wall. Dammerman's argument in favour of the sensory nature of the saccus is convincing. Not only is the wall composed of typical sensory cells and supporting cells, but the nerve and blood supplies provide additional evidence for his view. The sensory cells are characterized by a small protoplasmic protrusion into the cavity of the organ and carry about twenty small hairs, each of which ends in a little swelling. According to Dammerman the saccus is large in sea-fish, smaller in river-fish, and almost lacking in fishes of canals and ponds. Hence he suggested that its function is to estimate the pressure of the water, and therefore the depth at which the fish is swimming.

In spite of all the information in Dammerman's paper there still remain unsolved questions. For instance, successive stages in the development of the saccus of different species have not been described, and we are therefore not in a position to make valid statements as to its homology with parts of the infundibulum of other species. Moreover, we do not yet know whether there are relations between the hypophysis and the saccus vasculosus in fishes.

In this paper we deal with the development, structure, and homology of the saccus vasculosus and the possibility of a mutual influence between its tissues and those of the orohypophysis. The cytology of the saccus, including the differentiation of its cells, together with its possible function, will be treated in a second paper.

MATERIAL AND METHODS

Embryonic material was collected in Naples, and consisted of *Scylliorhinus caniculus* embryos of length 2.5 cm. (4 specimens), 3.3 cm. (4 specimens), 4.0 cm.

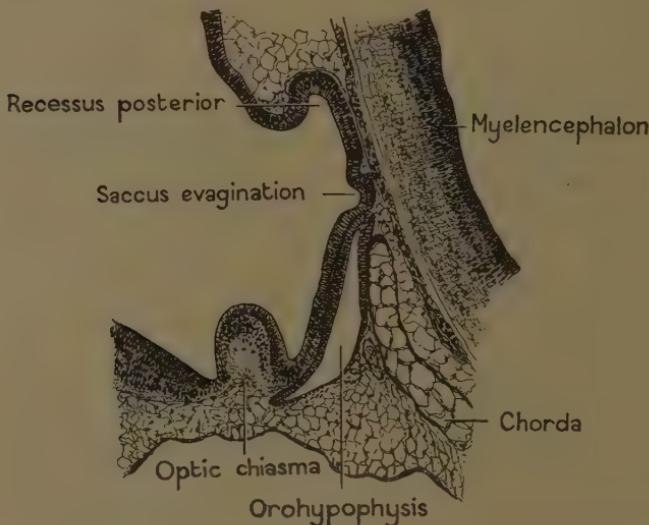
¹ Authors' address: Zoologisch Laboratorium der Rijks-Universiteit, Janskerhof 3, Utrecht, Holland.

(3 specimens), 4.7 cm. (1 specimen), and 5.5 cm. (1 specimen). The structure of the infundibular region of full-grown dogfish was studied in animals of 38–42 cm. length (5 specimens).

The material was fixed, with the requirements of cytological study in view, in the fluids of Bouin, Carnoy, Susa, Flemming, or Regaud. For the present work embryos stained with Heidenhain's iron-haematoxylin were used.

RESULTS

In an embryo of 2.5 cm. length the anlage of the *saccus vasculosus* is a bud-like evagination of the infundibular wall, almost half-way between the optic



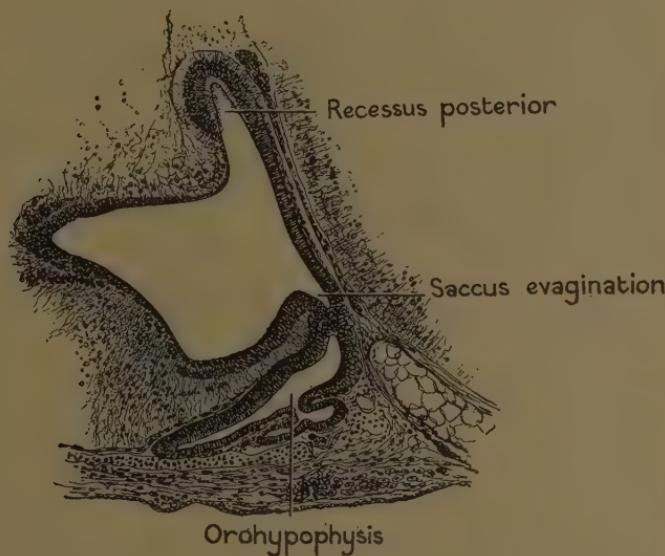
TEXT-FIG. 1. Embryo of 2.5 cm. length. Sagittal section of region of *saccus evagination*.
Magnification $\times 52$.

chiasma and the recessus posterior (Text-fig. 1). Its wall is compact and 3–4 cell-layers thick. Its cells have elongated nuclei, with a wide cytoplasmic border against the lumen. In this cytoplasmic layer we find, as in the other parts of the infundibular wall, several nuclei in division.

The orohypophysis is already formed, but is still connected with the buccal epithelium. It extends from a point below the middle of the optic chiasma as far as the ventral side of the *saccus evagination*, lying close to the lamina post-optica of the infundibular wall. Its most caudal part is in close contact with the ventral wall of the *saccus evagination*. Between the lamina postoptica and the orohypophysis there is always a thin layer of connective tissue, but in the region between orohypophysis and the *saccus evagination* connective tissue is totally

absent (Plate 1, fig. *a*). Here both tissues are intimately fused, but the arrangement of the nuclei is still such that they can be clearly distinguished. Blood capillaries are present against the caudal side of the saccus evagination. Caudal to the orohypophysis we find the notochord extending as far forward as the dorsal side of the saccus evagination; it terminates caudally to the point of contact between saccus and orohypophysis.

In an embryo of 3.3 cm. length the saccus anlage has grown out into a short tube-like evagination (Text-fig. 2). Its wall is still compact and several cell-layers thick. Nuclear divisions are scarce. The nuclei are distributed up to the ventricular margin of the cells, so that the cytoplasmic zone bordering the ventricle



TEXT-FIG. 2. Embryo of 3.3 cm. length. Sagittal (slightly parasagittal) section of region of saccus evagination. Magnification $\times 52$.

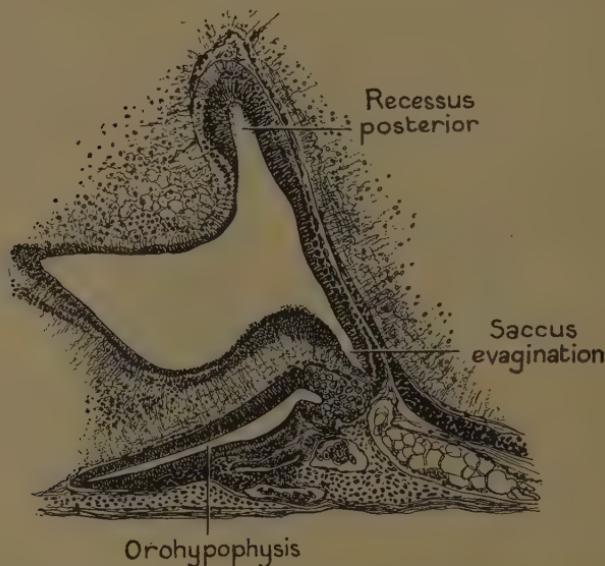
is nearly gone. In the dorsal wall of the evagination the first nuclear differentiation is visible: a row of nuclei have there become rounded at the side of the epithelium adjacent to the myelencephalon.

The orohypophysis has lost its communication with the buccal epithelium and is differentiated, in accordance with Woerdeman (1914), into a caudal part or Rathke's pouch, an elongated dorsal part lying along the lamina postoptica, and a ventral part which has constricted off from the dorsal part. The tissue of Rathke's pouch is closely connected with the end of the saccus evagination (Plate 1, fig. *b*). The two tissues are difficult to distinguish from each other, though one can see that the saccus wall in the region of contact is greatly flattened and somewhat broadened. Blood capillaries are visible on both sides of the

saccus and occupy the space between Rathke's pouch and the diencephalic wall. The end of the notochord is just caudal to the region of contact between saccus vasculosus and Rathke's pouch.

In an embryo 4 cm. in length the only striking changes are the elongation of the saccus evagination, the stretching of the brain, and the formation of fibres in the ventral wall of the saccus between its connexion with Rathke's pouch and the point of flexure of the ventral infundibular wall (Plate 1, fig. *c*).

At the stage of 4.7 cm. the saccus evagination is a little longer still, and somewhat wider at its ends. It has developed two lateral diverticula. Rathke's pouch



TEXT-FIG. 3. Embryo of 5.5 cm. length. Sagittal (slightly parasagittal) section of region of saccus evagination. Magnification $\times 55$.

is also widened; it is narrower in its median, broader in its lateral parts, and is only in contact with the median part of the saccus evagination. In the middle of this contact region fibres are developed (Plate 1, fig. *d*). The layer of fibres therefore now extends from the infundibular wall as far as the caudal end of the saccus evagination.

The most intimate connexion between the tissue of Rathke's pouch and that of the saccus is on either side of the midline (Plate 2, fig. *e*). The ventral and the dorsal wall of the saccus evagination are now clearly different. The structure of the ventral wall is like that of the normal infundibular wall. The dorsal wall, on the other hand, has its own characteristics: it is thinner and possesses a great number of large round nuclei at its base. The blood-supply of saccus and orohypophysis is derived from the hypophyseal artery, which arises from the anterior cerebral artery.

hypophysis is considerable. Especially striking are capillaries close to the dorsal wall of the saccus. The rostral end of the notochord reaches exactly to the caudal end of the saccus evagination.

In an embryo of 5·5 cm. length the saccus evagination is longer again and its cavity is narrower (Text-fig. 3). The saccus now takes the form of a broad flat sac with two rather extensive lateral diverticula. Rathke's pouch is much more compact than in the preceding stage. Only in its rather flat central part does it possess a cavity that is a direct prolongation of the cavity of the dorsal part of the orohypophysis. The lateral parts of Rathke's pouch each have a short tube-like cavity communicating with that of the central part; the most lateral parts are completely solid (Plate 2, fig. g).

It is this compact tissue alone which is in close connexion with the epithelium of the saccus evagination, and only here are both tissues intimately fused. In the medial region of contact between Rathke's pouch and saccus vasculosus the formation of fibres has continued. The epithelium of the ventral wall is becoming still thinner and is now about one or two cell-layers thick. Moreover, this epithelium is folded, so that the ventral wall of the evagination is very different from the dorsal one (Plate 2, fig. f). Obviously a decrease in the number of cells of the wall has taken place during development. The dorsal wall is quite straight and possesses on its outer side a layer of large round nuclei; whereas centrally there are elongated cells with oval nuclei at their base, and small cells with triangular nuclei are also present along the lumen. The characteristics of the saccus epithelium are therefore only developing in the dorsal wall of the evagination. On the other hand, the ventral wall of this evagination shows the characteristics of neurohypophyseal tissue.

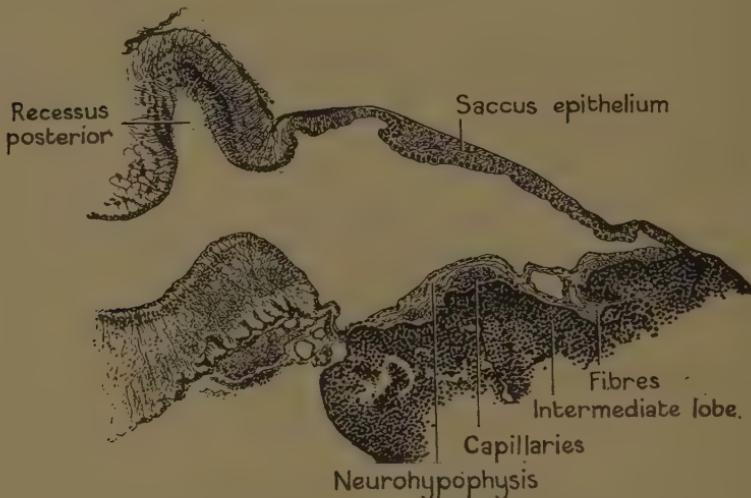
The blood-supply of hypophyseal and saccus tissue is rich. There is an especially great number of capillaries immediately beneath the saccus epithelium, and also in the rostrally and caudally situated spaces between Rathke's pouch and the neurohypophyseal tissue.

The rostral end of the notochord is situated immediately caudal to the tissue of Rathke's pouch.

In an adult animal of 38 cm. length all parts of the infundibular region are extremely enlarged. The saccus vasculosus is developed into a wide sac, with two lateral diverticula. Its cavity is in communication with the third ventricle (Text-fig. 4). The anterior lobe of the hypophysis is elongated and flat. It is situated immediately beneath the infundibulum, extending from the optic chiasma as far as the caudal end of the thick part of the infundibular wall. Caudal to this anterior lobe we find the very broad, largely compact, neuro-intermediate lobe in close contact with the ventral wall of the saccus evagination. The dorsal wall of the saccus contains, on its ventricular side, a very characteristic epithelium two to three cell-layers thick, of which coronet-cells are the most important elements. Beneath it we find a broad layer of wide capillaries and blood sinuses together with some connective tissue. Such a histological

structure is present everywhere in the saccus except in the region of contact with the tissue of the hypophysis.

In this medial region of contact the epithelium is flat, only one cell-layer thick, and is slightly folded at several points. Ventral to it is a layer of fibres,



TEXT-FIG. 4. *Saccus vasculosus*, hypophysis, and part of the infundibular region of an adult of 38 cm. length, in sagittal section. Magnification $\times 35$.

some of which penetrate as broad bundles into the open spaces between the tissue of the lobus intermedius. Several capillaries are situated between the layer of fibres and the hypophysis, and some are also present between the cell groups of the hypophysis.

Summarizing these observations we may state that the *saccus vasculosus* develops as an evagination of the infundibular wall, which soon changes into a dorso-ventrally flattened sac. This sac becomes lengthened and broadened and at the same time lateral diverticula are formed. The stretching of the brain alters the position of the saccus in such a way that at the end of development it is directed caudally.

One wall of the saccus evagination is from the earliest stages in close contact with the tissue of Rathke's pouch, the most caudal part of the orohypophysis. In a median section of this contact region in an embryo of 2.5 cm. length it can be easily seen that both tissues are intimately fused, though the component tissues are still recognizable (Plate 1, fig. a). Later, in an embryo of 3.3 cm. length, cells of both tissues form a mass in which the component elements are indistinguishable (Plate 1, fig. b). In an older stage (embryo 4 cm. in length)

differentiation has continued and the first indications of a different structure of the component elements appear (Plate 1, fig. *c*). When the embryo has reached a total length of 4·7 cm., it is only laterally, on both sides, that the tissues of Rathke's pouch and saccus vasculosus are in close contact (Plate 2, fig. *e*). In the median region both tissues are clearly distinguishable and already separated by small blood capillaries (Plate 1, fig. *d*). Further, a layer of fibres is formed in the saccus wall. In the next stage (embryo of 5·5 cm. length) this median region is longer and broader, the epithelium of the saccus is folded and only one cell-layer thick (Plate 2, fig. *f*), while only laterally do small regions of close contact persist (Plate 2, fig. *g*). In the adult animal (38 cm.) fibres are formed laterally as well, separating the two epithelia throughout the whole original region of contact (Text-fig. 4).

Meanwhile another process of differentiation is going on in the dorsal wall of the saccus evagination. This wall has no contact with Rathke's pouch. In it, at the 3·3 cm. stage, large round nuclei appear and differences in structure between ventral and dorsal walls of the saccus become established. This process of differentiation continues and the result is a dorsal wall of characteristic saccus epithelium, whereas the ventral wall is of neurohypophyseal tissue (Plate 2, fig. *f*).

DISCUSSION

Dammerman (1910) states that in *Squalus acanthias* the characteristic saccus epithelium is found everywhere in the saccus and therefore also in the folds that penetrate slightly into the hypophyseal tissue. This statement is in contradiction with our observations in *Scylliorhinus caniculus* and also with the observations of Gentes (1907) in *Torpedo marmorata* and *Scylium catulus* (= *S. stellare*). Dammerman may have studied more lateral sections, as the wall in the lateral diverticula of the saccus is entirely composed of the characteristic saccus epithelium.

The data given in the present paper show clearly a progressive transformation and a continuing differentiation of the ventral wall of the saccus evagination, by which the epithelium is flattened and a layer of fibres is formed which is separated from the hypophyseal tissue only by a broad layer of blood capillaries. Such a transformation has probably also taken place in *Squalus acanthias*, since Dammerman states that a layer of fibres and blood capillaries separated saccus epithelium from hypophyseal tissue. We would suggest that structural changes of the epithelium must also have been present, though it remains possible that in *Squalus acanthias* the situation is different from that in other species.

Our observations suggest that the ventral saccus wall in *Scylliorhinus caniculus* is transformed and differentiated into neurohypophyseal tissue by a process of continuing induction with the orohypophysis as the inductor. The wall of the saccus evagination has probably a tendency to develop into a characteristic saccus epithelium, and this tendency is suppressed in the ventral part of the wall by an influence exerted by the tissue of Rathke's pouch.

The question of the interrelationship between the infundibular and buccal components of the hypophysis has often been raised in the literature. Smith (1920) reported that in the albino frog the floor of the infundibular process, which is normally in contact with the orohypophysis, after removal of this orohypophysis does not undergo the secondary thickening normally taking place after the juxtaposition of the orohypophysis with the infundibulum, but retains its membranous nature. He concluded that the neural lobe and infundibular floor are dependent on the epithelial hypophysis for their complete development. Stein (1929) found no infundibular development in chorio-allantoic grafts of the chick without orohypophysis. On the other hand, a normal development of the infundibular wall occurred when both brain and orohypophyseal material were included in the grafts. Probably there is an action of orohypophyseal tissue on the infundibular wall. The work of Eakin and Bush (1951), however, raises some doubt about this conception. They repeated the work of Smith, removed the orohypophysis in an early tail-bud stage, and observed a development of the pars neuralis of normal size and histology. The neural lobe lacked, however, normal form. Their results indicate that only gross morphology of the pars neuralis is dependent upon the presence of orohypophyseal tissue.

Yet other data are available to indicate the reverse action of the infundibular wall on orohypophysis, this action being necessary for the formation of the pars intermedia of the hypophysis. Such evidence has been presented by, amongst others, Blount (1945), Eakin (1939), Gaillard (1937), and Hegre (1946).

It may be concluded that in amphibians, and probably also in birds and mammals, there is an interaction between orohypophysis and infundibulum. There is evidence that the infundibular wall is responsible for the differentiation of the intermediate lobe and the orohypophysis in its turn influences the neural material. The data given in this paper for a Selachian, *Scylliorhinus caniculus*, agree entirely with such an hypothesis, especially with the probability of an influence of the orohypophysis on the neural material.

Another point worth comment is the temporary formation of a cellular mass, from the tissues of orohypophysis and saccus evagination, in which the component elements are indistinguishable. In general we may say that during any induction process the tissues of the inductor and the reactor are in close contact. But their actual intermingling is not a general phenomenon. The region of mingling of both tissues which in *Scylliorhinus caniculus* is first observed medially and during development moves laterally may therefore be more than induction only. It is suggested that cells of the infundibular wall actually pass into the tissue of the orohypophysis. The decrease in the number of cells of the infundibular wall during development points in this direction. It was not possible, however, to confirm this hypothesis as there were no striking differences in nuclear structure or size between the elements of the two tissues.

Finally we may draw a conclusion from the above data as to the homology of the saccus vasculosus with other parts of the infundibulum of other species.

The striking similarity of the development of the processus infundibuli of mammals with the formation of the saccus vasculosus in fishes made Haller (1910) and also Grönberg (1901) arrive at the conclusion that these evaginations were homologous. Their opinion was not generally accepted. For instance, Haller von Hallerstein (1934) objected to it because in fishes both a saccus vasculosus and a processus infundibuli are present.

It seems to us that our data strongly favour the opinion of Haller and Grönberg. Those evaginations of the infundibular region are homologous which come totally or partly in close contact with the tissue of the orohypophysis and give rise to the lobus posterior and probably induce the lobus intermedius of the pituitary. Therefore the processus infundibuli of the hedgehog and those of the mouse and the roe-deer as described by Grönberg and Haller respectively, which during development unite with the orohypophysis, are homologous with the infundibular evagination of *Scylliorhinus caniculus*, which partly develops into neurohypophyseal tissue, partly into saccus vasculosus epithelium.

The objections of Haller von Hallerstein against this homology only apply to the fishes. As to the Selachia they are based mainly on the work of Edinger (1908), who distinguished two parts in the infundibular evagination of *Scylliorhinus caniculus*: a recessus infundibuli and, dorsal to it, a saccus vasculosus. The recessus is the evagination, the ventral wall of which is in close connexion with the hypophysis. The saccus is, according to Edinger, a second evagination dorsal to the recessus and characterized by epithelial folds.

Our observations on the same species demonstrate that this distinction is untenable if we pay attention to the development and the histological structure of the evagination. In *Scylliorhinus* there is only one evagination the structure of the wall of which differs in the ventral part where it makes contact with the orohypophyseal tissue.

In the Teleosts the question is somewhat more complex but still of the same nature. With regard to the infundibular region, this order can be divided into three groups. The first is formed by species which possess a broad infundibulum and a small recessus hypophyseos but lack a saccus vasculosus, as, for instance, *Esox* (Stendell, 1914; Dammerman, 1910) and *Gasterosteus* (Bock, 1928). In the second group we find again a broad infundibulum with a rostral recessus hypophyseos and a more or less large saccus vasculosus caudal to it, as in *Anguilla* (Stendell, 1914), *Mormyrus* (Stendell, 1914), and *Chrysophrys* (Gentes, 1907). Finally, in the last group we find a broad infundibular region with a rostral recessus hypophyseos and a caudal saccus evagination of large size, as in *Lophius* (Stendell) and *Zoarces* (Dammerman).

Further, there is in all species an evagination caudal to the saccus vasculosus which is called the recessus posterior. This is characterized by a special type of cell which distinguishes it clearly from other evaginations.

The recessus hypophyseos is in our opinion merely a secondary evagination, which originates during the formation of the neurohypophysis.

It is therefore tempting to consider the total broad infundibular evagination in Teleosts, including saccus vasculosus and recessus hypophyseos, as homologous with the processus infundibuli of mammals and the infundibular evagination of Selachii, and to accept a strong tendency towards formation of saccus epithelium in the ventral and caudal infundibular wall.

In agreement with the hypothesis given above about the inductive power of the orohypophysis, the following explanation of the differences of the infundibular region in Teleosts may be suggested:

If during development the orohypophysis reaches the infundibular wall and comes in contact with it along its whole length, the tendency to saccus epithelium formation is suppressed and saccus development does not occur.

If the orohypophysis reaches only the rostral half of the infundibular wall, saccus formation may occur in the free part, whereas in the rostral half this tendency is suppressed and neurohypophyseal formation is substituted.

If, lastly, the orohypophysis reaches only the most rostral part of the infundibulum as in *Lophius* or *Zoarces*, a large saccus will develop out of the caudal wall, whereas the neurohypophyseal tissue will be small.

Experimental analysis will be needed to confirm this hypothesis.

SUMMARY

1. In *Scylliorhinus caniculus* the saccus vasculosus develops as an infundibular evagination.
2. From an early stage of development there is a close contact between the tissue of Rathke's pouch and the most caudal part of the infundibular evagination. During development the region of close contact shifts laterally to either side of the midline.
3. The ventral wall of the evagination develops into neurohypophyseal tissue, the dorsal into saccus vasculosus epithelium.
4. It is suggested that a process of continuing induction is responsible for the progressive transformation of the ventral wall into neurohypophyseal tissue; the dorsal wall on the contrary is free to follow its own tendency to develop into saccus epithelium.
5. On the basis of developmental criteria, the homology of the saccus vasculosus with the processus infundibuli of mammals is suggested.
6. It is suggested that in Teleosts the broad infundibular wall is homologous with the saccus evagination of Selachii and the processus infundibuli of mammals; and that it depends on the size of the region of contact between orohypophysis and infundibulum whether a large or a small saccus, or none at all, develops.

The first author wishes to thank the Royal Academy of Sciences at Amsterdam for the opportunity of using the table of the Netherlands Government in the

Zoological Station at Naples. He is under great obligation to the Director, Professor R. Dohrn, and his collaborators of the Stazione Zoologica for their hospitality and highly appreciated help. Lastly we have pleasure in thanking Professor Chr. P. Raven for his interest and valuable suggestions during the work.

REFERENCES

BLOUNT, R. F. (1945). The interrelationship of the parts of the hypophysis in development. *J. exp. Zool.* **100**, 79-94.

BOCK, FR. (1928). Die Hypophyse des Stichlings (*Gasterosteus aculeatus L.*) unter besonderer Berücksichtigung der jahreszyklischen Veränderungen. *Z. wiss. Zool.* **131**, 645-710.

DAMMERMAN, K. W. (1910). Der Saccus vasculosus der Fische ein Tiefeorgan. *Z. wiss. Zool.* **96**, 654-726.

EAKIN, R. M. (1939). Correlative differentiation of the intermediate lobe of the pituitary in *Triturus torosus*. *Growth*, **3**, 373-80.

— and BUSH, F. E. (1951). The development of the neural lobe of the pituitary in hypophysectomised embryos of the Tree-frog, *Hyla regilla*. *Anat. Rec.* **111**, abs. 544-5.

EDINGER, L. (1908). *Vorlesungen über den Bau der nervösen Zentralorgane des Menschen und der Tiere*, **2**, Leipzig.

GAILLARD, P. J. (1937). An experimental contribution to the origin of the pars intermedia of the hypophysis. *Acta neerl. Morph.* **1**, 3-11.

GENTES, L. (1907). Recherches sur l'hypophyse et le sac vasculaire des vertébrés. *Trav. Lab., Soc. Sci. Arcachon*, **10**, 129-281.

GRÖNBERG, G. (1901). Die Ontogenese eines niedern Säugergehirns nach Untersuchungen an *Erinaceus europaeus*. *Zool. Jb. (Abt. f. Anat. und Ontog.)* **15**, 261-384.

HALLER, B. (1910). Ueber die Ontogenese des Saccus vasculosus und der Hypophyse der Säugetiere. *Anat. Anz.* **37**, 242-6.

HALLER VON HALLERSTEIN, V. (1934). Zerebrospinale Nervensystem, im Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E., and Lubosch, W. *Handbuch der vergl. Anat. der Wirbeltiere*, Bd. **2**, Hf. 1. Berlin: Urban & Schwarzenberg.

HEGRE, E. S. (1946). The developmental stage at which the intermediate lobe of the hypophysis becomes determined. *J. exp. Zool.* **103**, 321-30.

SMITH, P. E. (1920). The pigmentary, growth and endocrine disturbances induced in the anuran tadpole by the early ablation of the pars buccalis of the hypophysis. *Amer. anat. Memoirs*, **11**, 1-112.

STEIN, K. F. (1929). Early embryonic differentiation of the chick hypophysis as shown in chorio-allantoic grafts. *Anat. Rec.* **43**, 221-37.

STENDELL, W. (1914). Die Hypophysis cerebri der Vertebraten. In Oppel, A., *Lehrbuch der vergl. mikrosk. Anat.* **8**. Jena: Gustav Fischer.

WOERDEMAN, M. W. (1914). Vergleichende Ontogenie der Hypophyse. *Arch. mikr. Anat.* **86**, Abt. I, 198-291.

EXPLANATION OF PLATES

The magnification of all photographs is $\times 320$.

Abbreviations: *d.w.* dorsal wall of saccus vasculosus; *f.* fibres; *i.w.* infundibular wall; *n.h.* neurohypophysis; *o.h.* orohypophysis; *R.p.* Rathke's pouch; *s.v.* saccus vasculosus; *v.w.* ventral wall of saccus vasculosus.

PLATE 1

FIG. a. Embryo of 2.5 cm. length. Sagittal (slightly parasagittal) section.

FIG. b. Embryo of 3.3 cm. length. Sagittal section. Above and below the region of junction of orohypophysis and saccus there are blood capillaries. In the dorsal wall of the saccus the first appearance of large nuclei at the base has occurred.

FIG. c. Embryo of 4 cm. length. Sagittal section. The differentiation of the dorsal saccus wall and of the intermediate cellular mass has continued.

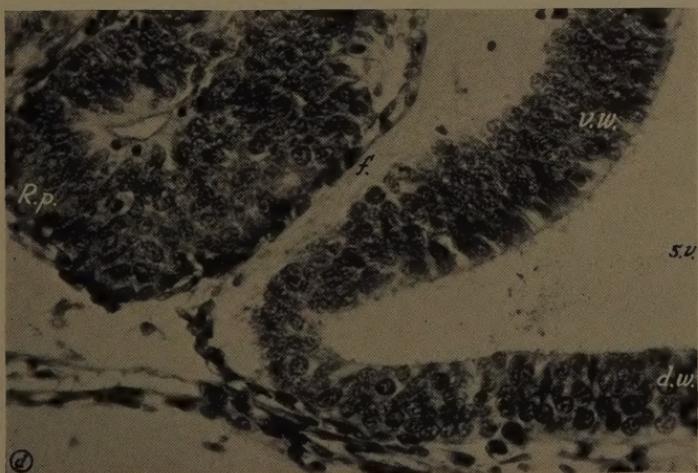
FIG. *d*. Embryo 4.7 cm. length. Sagittal section. Formation of fibres in the ventral saccus wall. Differentiation of the dorsal wall. Capillaries close to the wall.

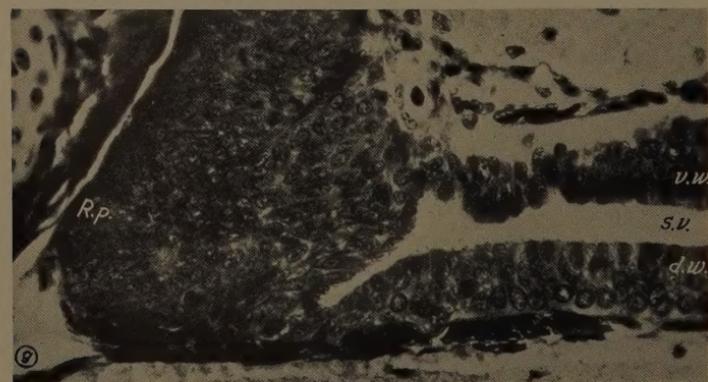
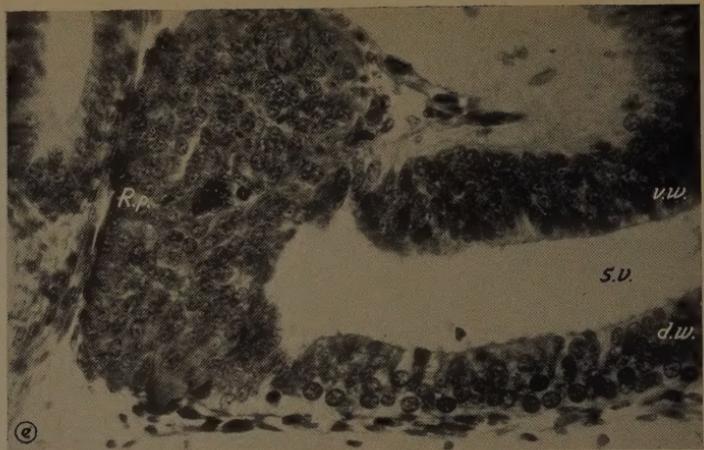
PLATE 2

FIG. *e*. Embryo 4.7 cm. length. Parasagittal section. On the left, tissue of the orohypophysis (Rathke's pouch), in close connexion with the saccus evagination on the right.

FIG. *f*. Embryo 5.5 cm. length. Sagittal section. The ventral saccus wall is folded with epithelium one cell-layer thick, and nerve-fibres. Differentiation of the dorsal wall into saccus epithelium.

FIG. *g*. Embryo of 5.5 cm. length. Parasagittal section. Rathke's pouch tissue in close connexion with the saccus evagination on the right.





J. C. VAN DE KAMER and A. J. SCHUURMANS
Plate 2

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript.

The Summary should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, &c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of journal (World List of Scientific Periodicals abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. mikr. Anat.* **100**, 599-683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

Illustrations. Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general, their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

Black and white line or line and dot drawings should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', &c.

Half-tone illustrations (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

Proofs. Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

Reprints. Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

Journal of
Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

VOLUME 1

March 1953

PART 1

Contents

DALCQ, A. M.	
Foreword	1
PASTEELS, J.	
Les effets de la centrifugation sur la blastula et la jeune gastrula des Amphibiens. I. Mécanisme de la formation des organes secondaires aux dépens de l'ectoblaste	5
CLAYTON, R. M.	
Distribution of Antigens in the Developing Newt Embryo	25
BRØNDSTED, H. V.	
Rate of Regeneration in Planarians after Starvation	43
BRØNDSTED, A. and H. V.	
The Acceleration of Regeneration in Starved Planarians by Ribonucleic Acid	49
WOLFF, ET., HAFFEN, K., KIENY, M., et WOLFF, EM.	
Essais de cultures <i>in vitro</i> d'organes embryonnaires en milieux synthétiques	55
KAMER, J. C. VAN DE, and SCHUURMANS, A. J.	
Development and Structure of the Saccus Vasculosus of <i>Scylliorhinus caniculus</i> (L.)	85